

발간등록번호

11-1543000-001796-01

**한국형 신규 유산균 발굴을 통한 고부가가치 발효
진세노사이드 소재개발**

경희대학교

농림축산식품부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “기술사업화지원사업”(개발기간 : 2013. 11.20 ~ 2017. 3.19의 최종보고서로 제출합니다.

2017 . 5. 4.

주관연구기관명 : 경희대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 양덕춘
세부(협동)연구책임자 : 김연주
이대희
김호빈
배귀식
민진우

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	313038-3	해당 단계 연구 기간	2015.11.20. ~ 2017. 3.19.	단계 구분	3차년도 (총 3 단계)
연구사업명	중사업명	기술사업화지원			
	세부사업명				
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	한국형 신규 유산균 발굴을 통한 고부가가치 발효 진세노사이드 소재 개발			
연구책임자	양덕춘	해당단계 참여 연구원 수	총: 40명 내부: 40명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 205,000천원 계:505,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 120명 내부: 120명 외부: 명	총 연구개발비	정부:900,000천원 민간:635,000천원 계: 1,535,000천원
연구기관명 및 소속부서명				참여기업명 샘표식품(주), 한방바이오(주), (주)웅진식품, 지에프씨(주)	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수 285	

4. 국문 요약문

	코드번호	D-01
<p style="text-align: center;">연구의 목적 및 내용</p>		<ul style="list-style-type: none"> ○ 기 확보 한국형 신종 유용균주의 상업화를 위한 기술개발 <ul style="list-style-type: none"> - 선행연구를 통해 개발된 균주의 기능 특성화 - 이차대사산물 분해 및 합성 관련 활성 균주 개발 - 면역 활성 검정을 통한 면역력 강화 균주의 개발 ○ 면역활성증진 기능성 식품개발 <ul style="list-style-type: none"> - 유산균을 활용한 면역활성 프로바이오틱 소재 개발 - 혼합배양을 활용한 면역력 증진 기능성 소재 개발 - 기능성 소재의 표준화를 위한 분석법 개발 ○ 연구개발물질의 상용화를 위한 제형화 및 제품화 <ul style="list-style-type: none"> - 기능성 제품 등록을 위한 절차 및 관련제도 조사 - 원료, 가공공정 제품 표준화를 위한 프로세스 확립 - 최종 Prototype의 가공적성/안전성/안정성 실험 - 브랜드 naming, 마케팅 타겟 설정, 초기 런칭을 위한 홍보체계 구축 ○ 총 사포닌 함량 증대 인삼/산삼배양근 배양기술을 개발함. <ul style="list-style-type: none"> - 사포닌 증대 조직배양 표준화를 위한 프로세스 확립 - 최적 Growth curve에 따른 생산 표준화를 위한 프로세스 확립 ○ 특수사포닌 및 그 전구체 대량 생산을 위한 균주 및 발효 기술을 개발함. <ul style="list-style-type: none"> - 진세노사이드 전환 프로세스 확립 - 진세노사이드 전환율에 따른 발효공정 표준화를 위한 프로세스 확립 ○ 향산화/피로회복/면역 등의 다양한 기능성을 확인함. <ul style="list-style-type: none"> - 기능성 관련 추출, 분리, 정제 기기분석, <i>In vitro</i>, <i>In vivo</i> 프로세스 확립 ○ 상품화를 위한 목표 기술로써 시장 진입을 위한 제형 및 제품화 기술을 개발함. <ul style="list-style-type: none"> - 원료, 가공공정, 제품 표준화를 위한 프로세스 확립 - 최종 Prototype의 가공적성/안전성/안정성 실험 ○ 유용균주와 식물 이차대사산물을 활용한 고기능 소재 및 제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물과 열처리를 통한 진세노사이드 Rg2 및 C-K의 대량생산 - 변환된 진세노사이드 Rg2 및 C-K에 의한 면역강화제품 개발 - 발효를 통한 국내약용소재로부터 특수 사포닌의 대량생산 - 발효 국내약용소재를 이용한 고부가가치 비누 및 향장품의 개발

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효를 통한 기능성 화장품 소재 개발 및 제품화 <ul style="list-style-type: none"> - 전처리 공정, 선택적 추출, 조합 기술 발효기술을 활용한 기능성 개선 - 발효물의 profile 분석 및 발효생성물의 구조 동정 - 효능평가를 통한 기능성 타겟 물질의 선정 - 기능성 화장품 원료 개발 및 시생산 - 기능성 평가를 위한 임상 연구 ○ 미생물발효를 통한 Ginsenoside C-K 고함유 기능성 제품개발 <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 발효를 통한 인삼 고기능성 사포닌 개발 - 발효를 통한 Ginsenoside C-K 타겟 기능성 물질 생산 - 기준 규격 및 함량 시험 - 국내 농산물과 유용균주의 혼합을 통한 고기능성화 - 효능물질 발굴 연구를 통한 제품의 표준화 - 인삼 기능성 강화 제품 개발 				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> - 한국형 신규 토종 미생물의 분리 개발은 국외의 미생물 자원에 의존 하던 기존의 기술적 한계에서 벗어나 원천기술을 확보 - 미생물의 <u>기능성 증진 및 표준화 연구</u> - 미생물 발효에 의한 유효성분 조절 기술은 기존의 특정 성분의 강화와는 차별되는 기술로 <u>타겟 효능에 대한 맞춤형 제품 개발의 원천기술 확보</u> - 유효성분의 선택적 추출 및 기호도 개선 기술은 <u>현장에서 적용 가능한 공정기술 개발</u> - 업적으로 다양한 분야에 적용이 가능한 균주 자체의 원천적 기술 및 특허의 확보 - 건강기능식품 및 화장품 적용 시험을 통한 고부가가치 소재개발 - 화장품 관련 임상시험을 통한 비고시 기능성 소재화 연구 수행 				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고기능성 원료생산 기술 확보 및 원료의 표준화 가능 ○ 효능 타겟형 인삼의 유효성분을 조절할 수 있는 원천 기술 확보 ○ 참여기업을 통한 자체 상품화 및 해외시장 진출을 위한 홍보/마케팅 프로세스 구축가능 ○ 개발기술의 참여기업 등을 통한 상업화로 기능성식품, 일반식품, 화장품에 적용하여 시장 진출 모색함 				
중심어 (5개 이내)	미생물	유산균	발효	이차대사산물	기능성물질

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> - Identification of highly functional materials through securing separation of domestic native microorganism resources <ul style="list-style-type: none"> - Production of raw materials through the development of functional materials through microbial fermentation as a target technology for commercialization - Targeted active ingredient control technology, consumer-friendly preference improvement technology, development of formulation and commercialization technology for market entry 		
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of technology for the commercialization of new type of useful Korean strains <ul style="list-style-type: none"> - Functional characterization of strains developed through previous studies - Development of active metabolites related to degradation and synthesis of secondary metabolites - Development of immunity-enhancing strains by immunoactivity assay ○ Development of immunogenic activity-enhancing functional food <ul style="list-style-type: none"> - Developed immune-active probiotic material using lactic acid bacteria - Development of immunity-enhancing functional material using mixed culture - Development of analytical method for standardization of functional materials ○ Formulation and commercialization for the commercialization of research and development materials <ul style="list-style-type: none"> - Procedures and related systems investigation for functional product registration - Establishment of process for product standardization of raw materials and processing process - Processing aptitude / safety / stability experiment of final prototype - Establishment of marketing system for brand naming, marketing target setting, initial launch ○ Increase the total saponin content Developed ginseng / wild ginseng culture root culture technology. <ul style="list-style-type: none"> - Establishment of a process for the standardization of tissue culture with increased saponin <ul style="list-style-type: none"> - Establishment of process for standardization of production according to optimum growth curve 		

- Developed strains and fermentation technology for mass production of special saponins and their precursors.
 - Establishing Gin Senocide conversion process
 - Establishment of process for standardization of fermentation process according to conversion rate of ginsenoside
- Various functionalities such as antioxidant / fatigue recovery / immunity are confirmed.
 - Functional extraction, separation, purification device analysis, establishment of in vitro and in vivo process
- Developing formulation and commercialization technology for market entry as target technology for commercialization.
 - Establish processes for raw materials, processing processes, and product standardization
 - Processing aptitude / safety / stability experiment of final prototype
- Development of high-performance materials and products utilizing useful strains and plant secondary metabolites
 - Mass production of jinsenoside Rg2 and C-K through microorganism and heat treatment
 - Development of Immunity Enhancement Products by Converted Jinsenoside Rg2 and C-K
 - Mass production of special saponin from Hwangchulchu tree through fermentation
 - Development of high value-added soaps and fragrance products using fermented yellowtail extract
- Development and commercialization of functional cosmetic materials through fermentation
 - Pre-processing, selective extraction, combination technology Improvement of function using fermentation technology
 - Profile analysis of fermented products and identification of the structure of fermented products
 - Selection of Functional Target Substance through Efficacy Assessment
 - Development and production of functional cosmetic ingredients
 - Clinical studies for functional evaluation
- Development of Ginsenoside C-K highly functional product through microbial fermentation
 - Development of ginseng high functional saponin through microbial fermentation
 - Production of Ginsenoside C-K target functional substance through

	fermentation - Reference standard and content test - High-functioning by mixing domestic agricultural products and useful strains - standardization of products by researching efficacy substances - Developed ginseng functional strengthening product				
Expected Contribution	○ Securing high functional raw material production technology and standardization of raw materials ○ Source technology to control effective ingredients of efficacy target type ginseng ○ Promotion / marketing process can be built for self-commercialization and overseas market entry through participating companies ○ Commercialized through the participating companies of development technology, and applied to functional foods, general foods, cosmetics, etc.				
Keywords	microorganism	lactic acid bacteria	fermentation	Secondary metabolite	Functional material

6. 영문목차

1. Introduction of research and development	1
2. Domestic and Overseas Technology Development Status	11
3. Research Results and Results	17
4. Achievement of goal and contribution to related field	241
5. Use of research results	248
6. Overseas science and technology information	259
7. Security rating of R & D achievement	260
8. Research facilities	260
9.	260
10. Representative Research Result of R&D	261
11. Other Matters	261
12. Reference	261

<별첨> 자체평가의견서

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	11
3. 연구수행 내용 및 결과	17
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	241
5. 연구결과의 활용계획 등	248
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	259
7. 연구개발성과의 보안등급	260
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	260
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	260
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	261
11. 기타사항	261
12. 참고문헌	261

<별첨> 자체평가의견서

8. 뒷면지

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

제 1절. 연구개발의 목적

한국을 대표하며 종주국인 고려인삼의 산업을 활성화시켜 세계시장에서 그 우수성을 인정받고자 고려인삼의 차별화 된 우수성을 증명하고 국제적인 경쟁력을 높이고자 한다. 최근 시장에서의 고려인삼은 다른 기능성 소재들과의 차별화에 실패하여 경쟁력이 크게 약화되고 있는 실정이다. 주로 수입에 의존하고 있는 기능성 소재에 대한 대응 방안으로서 본 연구팀이 가지고 있는 한국 토종 미생물을 활용하여 다양한 제형의 소재를 개발하고 이를 제품화 함으로써 “기능성 소재 개발의 국내 원천기술의 확보 및 제품화 통한 시장 경쟁력 강화”하고자 한다. 보다 과학적 증명 및 기전을 규명하여 고려인삼의 국제적 경쟁력 강화를 목표로 인삼산업 관련종사자의 문제점을 해결하고 인삼산업 및 해외수출을 증진시키고자 한다.

**한국형 신규 유산균 활용을 통한 소재의 개발
식물 소재와 유산균 혼합 배양을 통한 유용 대사체 개발**

산업화 기술의 확보



**기능성 소재 개발의 국내 원천기술의 확보 및
제품화 통한 시장 경쟁력 강화**

제 2절. 연구의 필요성

가. 기능성 소재 시장의 확대 및 문제점

- 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 각종 기능성을 가지는 소재들이 본격적으로 개발되고 있다. 최근 미생물 소재 및 식물에서 유래된 다양한 이차대사산물 등 자연에 존재하는 천연물질이 합성의약품의 부작용을 보완할 수 있는 대체제로서 가치가 높아지고 있다. 경제적인 발전에 따른 삶의 질의 향상으로 전세계적으로 건강에 대한 관심이 폭발적으로 증가함에 따라 천연물에 대한 수요증가 웰빙컨셉과 더불어 전 세계적 트렌드로 자리잡고 있다.
- 과거 주로 천연물을 추출하여 기능성 식품 소재로 이용되어지던 이러한 물질들은 산업의 융합 과학 기술의 발전에 따라 그 경계가 점차적으로 사라지고 있는 추세이다. 이러한 기능성 소재들은 식품으로서의 기능성 뿐 아니라 의약품 소재로의 기능성과 더불어 주름, 미백등 화장품 소재로서의 기능성도 가지는 물질이 다량 존재하여 최근에 와서는 의약품 및 화장품시장에 적용되어 새로운 소재로 활용되고 있어 다양한 산업에 직접적으로 활용될 수 있는 고부가가치 소재이다.
- 하지만, 각종 기능성 강화를 위해 천연물질이 지속적으로 각광받는 이면에는 대다수의 천연물질들이 성분 규격화가 이루어지지 않고 있어 안전하고 규격화된 제품개발이 어렵다는 단점을 가지고 있다. 따라서 이들에 대한 정확한 성분과 효능, 안정성, 부작용 등이 과학적인 기준에 따라 밝혀 이들 성분을 명확히 해야 하며 산업화 및 표준화를 위한 보다 체계적인 연구가 필요가 있다.
- 더불어 국내 기능성 소재의 대부분이 수입에 의존함으로써 국내 산업 경쟁력의 저해 요인이 되고 있어 이를 극복해야 할 방안이 필요하다. 특히, 최근 주목 받는 발효 소재의 경우 미생물은 물론 발효에 이용 될 농산물 까지도 수입 소재를 활용하여 국내 농가 소득에 악영향을 주고 있는 실정이다.
- '11년 인정된 기능성 소재 총 42건 중 국내개발 소재는 12건으로 국내개발 비중이 '08년 이후 증가하는 추세지만 아직까지 수입 소재의 30% 수준 미만으로 국내 소재를 활용하여 기능성 제품화 하는 것이 시급한 실정이다.

표 1. 국내 기능성 소재 생산 실적

구분	'04년	'05년	'06년	'07년	'08년	'09년	'10년	'11년	총계
수입	4	15	19	27	65	73	50	30	283
국내 제조	5	8	10	9	19	24	18	12	105
국내%	56	35	35	25	23	25	27	29	

나. 미생물 소재 시장 현황

- 세계적인 경기 불황에도 불구하고 전세계 미생물관련 제품 시장은 매년 10% 이상의 고성장을 하고 있으며 미생물 제품의 세계적인 시장 규모는 2011년 1,560억 달러였으며, 2016년에는 2,590억 달러를 초과하며 5년간의 연평균 성장률은 10.7%에 이를 전망이다.
- 국내 미생물 산업의 시장규모는 발효 식품시장이 약 4조 5천억 원을 넘는 규모. 또한, 효소시장은 410억 원, 항생제 3,862억 원, 단백질 2,482억 원, 농업 미생물제제 시장으로 100억 원의 시장을 형성하고 있어 매우 큰 시장을 형성 하고 있는 것을 알 수 있다.
- 특히 발효에 주로 이용되는 유산균의 경우 과거 주로 낙농업에 이용되었던 소재에서 발전하여 기능성 물질로 주목받고 있는 상황이다.
- 세계 유산균 시장은 연평균 12.6%의 성장세로 2014년 326억 달러에 육박할 것으로 예상되는 가운데, 원료용 유산균이 70%(230억 달러)를 차지할 것으로 전망된다. 또 미국 유산균시장은 2009년에서 2014년까지 연평균 17%의 지속 성장할 것으로 관련업계는 내다보고 있다. 이처럼 유산균 시장은 전세계적으로 지속적으로 성장하고 있으며 우리나라도 연 1조원의 시장 규모로 성장하고 있는 추세이다. 최근에는 프로바이오틱스가 천연 의약품 소재로 주목 받으면서 유산균 시장이 크게 확대되고 있다. 미국의 경우 치료약과 예방약의 개념으로 의약품으로 까지 개발을 하려 유도하고 있으며 FDA를 비롯한 관련 기관들은 약효식품 상품에 대한 규제를 완화하고 있다.
- 그러나 우리나라의 경우 식품으로서의 유산균 이외에는 큰 성과를 이루지 못하고 있는 실정이다. 이는 우리나라의 유산균 연구가 대부분 유제품을 중심으로 이루어지고 산업화 되어 있기 때문일 것으로 사료된다. 전 세계적으로 유산균의 기능성에 주목하여 합성 기능성 원료의 대체제로서 큰 각광을 받기 시작하였지만 아직까지도 우리나라의 경우는 적절한 대응을 하지 못하고 있어 경쟁력을 갖추지 못하고 있는 상황이다. 대부분의 원료를 수입에 의존하고 있어 국내 업체에서 기술적 주도권을 가지지 못해 경쟁력을 갖추지 못하고 있다. 따라서 체계적인 연구 및 균주의 개발을 통한 관련 산업에 대한 경쟁력을 갖추어야 할 필요가 있다.

미생물 원료의
수입 의존



균주 개발을 통한
원천기술 확보 필요

다. 미생물을 활용한 기능성 물질의 개발

- 미생물은 식, 음료 및 의약품, 화장품, 환경 소재에 까지 폭넓게 이용되고 있어 미래 산업의 중요한 성장 자원으로 인식되고 있다. 이 때문에 "미국 유럽 일본 등은 우수 미생물 확보"를 통해 앞으로 산업 발전에 집중 투자하고 있다. 특히, "생물자원에 대한 원천기술을 획득하기 위해서는 유용한 생물자원의 선점이 무엇보다 필수적"이며 미생물 확보 자체가 국가경쟁력이 될 것이라는 전망도 나오고 있다.
- 미생물은 주로 Probiotics, Prebiotics 등에 주로 사용 되어 왔다. Probiotics 시장의 경우 주로 유산균 및 비피더스 균주를 중심으로 한 유제품에 이용되고 있다. 국내에서도 많은 유제품 관련 기업에서 유산균등의 이용이 활성화 되었으나 대부분 자체 균주의 보유가 아닌 해외에서 개발되어진 균주를 활용하고 있는 실정이다.
- Prebiotics 연구는 올리고당, 식이섬유, 락티톨 등을 개발하기 위한 방법으로 주로 사용 되어 왔다. 아미노산의 경우 약 2조원에 해당하는 규모로 매년 성장하는 추세로 성장 가능성이 매우 높은 분야 중 하나이지만 국내의 경우 원천 기술 확보에 다소 미흡한 실정이다.
- 본 연구팀에서는 사전연구를 통하여 한국형 유산균을 포함한 다양한 신종균주를 보유하고 있어 각종 기능성 제형 생산의 원천기술을 확보 하고 이를 상업적으로 이용하고자 한다. 특히, 기존의 단순 미생물 활용에서 벗어나 생물전환 기술을 이용하여 고기능성 물질을 대량 생산하는 연구를 병행하여 미생물을 이용한 고부가가치 농산물 제품을 생산하고자한다.
- 생물전환기술이란 생물전환, 생합성, 생촉매 등의 용어와 의미상 중복성을 가지며, 미생물이 갖고 있는 효소적 기능을 이용하여 전구물질로부터 원하는 산물을 제조하는 기술을 말한다. 따라서 생체기능을 세포 또는 효소단계에서 이용하는 생물전환기술은 유용물질 생산을 주요 목적으로 하여 현재의 생물공업을 구성하는 주요한 공정과정이라 할 수 있다. 참고로 생물전환기술과 발효기술의 차이에 대해 간략하게 요약한다면,

생물전환 공정은 기존의 발효공정과 비교해 볼 때, 두 공정이 생물반응계를 이용한다는 점에서 공통점을 갖지만, 발효공정이 상대적으로 간단한 원료물질(주로 균체성장에 필요한 영양성분)에서 출발하여 균체 내의 생명현상을 이용하여 생산물을 얻어내는 반면 생물전환 공정은 미생물 또는 효소의 기질에 대한 선택성을 이용, 전구물질을 도입하여 목적하는 화합물을 생산한다는 점에서 차이가 있다

표 2. 생물전환기술을 통한 천연물의 고부가가치화

	생물화학기술		화학합성기술
	생물전환기술	발효기술	
이용기술	생체 및 생물촉매	생체(생육)	촉매
반응	생화학반응	생명현상	화학반응
반응조건	상온상압	상온상압	고온고압
에너지이용	에너지절약형	에너지절약형	에너지소비형
특이성	높음	높음	낮음
생성물의 종류	천연,비천연물	천연물	비천연물
생성물의 농도	낮음(일부 높음)	낮음	높음
사용장치의 규모	소규모	대규모의 장치산업	대규모의 장치산업
환경오염문제	환경적합형	환경적합 /환경부적합형	환경부적합형

○ 본 연구에서는 국내의 미생물 및 자원을 활용한 고부가가치 소재의 개발 및 제품화를 통해 우리나라의 산업 경쟁력을 보다 강화하여야 할 것으로 판단된다. 본 연구팀은 사전 연구를 통하여 다양한 종류의 한국형 미생물을 확보 하고 있으며 특히, 식물의 2차 대사산물 전환에 관여하는 신종 유산균주를 보유하고 있어 국내 농산물과의 혼합 배양을 통해 보다 고기능성의 물질을 발굴하고 이를 직접적으로 산업화 시킬 수 있다. 이는 한국형 토종 미생물을 활용한 원천적 기술의 확보는 물론 국내 농산물을 병행하여 활용함으로써 국내 농산품의 수요를 증진 시키고 결과적으로 국내 농가의 소득 확대에 기여 할 수 있을 것으로 판단된다. 더불어 미생물 생물전환에 의한 다양한 건강 기능성식품 및 기능성 화장품 소재로의 개발을 통하여 기존에 존재하는 소재가 아닌 독창적인 기능성 소재의 생산이 가능해 국제적 경쟁력을 확보 할 수 있을 것을 기대 된다.

3절. 연구개발 범위.

[제 1세부: 한국형 토종 미생물을 통한 유효성분의 생산 기술 개발]

○연구개발의 목표

한국형 토종 미생물의 분리 및 발효를 통한 유효성분 생산기술 개발

○연구개발의 내용

- 최적미생물 배양방법의 확립 및 협동과제를 통한 probiotics 제품화
 - 기능성 성분(원료)의 규격 기준의 설정
 - 참여기업을 통한 probiotics 제품화

- 미생물과 농산물간의 혼합배양을 통한 고기능성 소재 개발 및 기능성 성분의 표준화
 - 기능성 성분(원료)의 규격 기준의 설정
 - 기능성 성분의 제조공정 검토 및 표준화
 - 기능성 성분의 함량 및 품질의 표준화

- 인삼 기능성 강화 제품 개발
 - 미생물 발효를 통한 인삼(뿌리, 지상부) 고기능성 사포닌 개발
 - Ginsenoside C-K 타겟 기능성 물질 생산
 - 미생물과 열처리에 의한 Ginsenoside Rk1 및 Rg5의 생산
 - 기준 규격 및 함량 시험
 - 연구 기술 개발 후 협동과제로 기술 이전을 통한 제품화

- 산삼배양근을 활용한 면역강화 소재 제품 개발
 - 산삼배양근 발효 후 효능 표준물질의 profiling 분석
 - 산삼배양근 발효 소재의 면역 기능성 검정
 - 연구 기술 개발 후 협동과제로 기술 이전을 통한 제품화

- 유산균을 이용한 기능성 화장품 소재 개발
 - 유산균 발효물에 대한 화장품 소재 기능성 평가
 - 향산화 능력 검정 및 미백 기능성 확인
 - 임상 시험(협동과제-지에프씨) 원료의 생산
 - 연구 기술 개발 후 참여기업 기술 이전을 통한 제품화

- 유산균을 이용한 황칠로부터 비누 및 향장품 소재 개발
 - 황칠의 엑기스로부터 유산균 처리한 특수소재 생산
 - 발효된 황칠엑기스의 미백, 주름개선등에 대한 기능성 평가

- 연구 기술 개발 후 참여기업 기술 이전을 통한 제품화

[제 2세부: 한국형 미생물을 활용한 Probiotic 고기능성 소재 개발 및 기능성 검정]

○연구개발의 목표

- 한국형 미생물을 활용한 고기능성 Probiotic 고기능성 소재 제품 개발
- Probiotic 및 prebiotics의 생산 및 in vitro 기능성 검정
- 한국형 미생물을 이용한 발효물의 면역조절 효능 및 골질환 응용가능성 탐색
- 식물 추출물과 한국형 미생물의 혼합 발효를 통해 개발된 고기능성 소재를 이용한 제품 개발

○연구개발의 내용

- 기능성 검정을 통한 특정 기능성분 탐색

- 면역세포에 대한 세포독성
- 면역관련 세포의 mytogen에 대한 반응성 조사
- 항원특이적 사이토카인 유도활성
- Flow cytometer를 이용한 면역세포 표면 항원 분석

- 제품개발을 위한 캐리어 개발

- 식물추출물 표준화 및 최적화
- Scale-up을 통한 표준화 구축
- 최종 Prototype 시제품 생산

- 기능성 강화 probiotic 제품개발

- probiotic 기능성 시장 동향 및 현황 조사
- 소비자 니즈 및 동향 분석 및 제형 기호도/선호도 조사
- 레시피 및 제품 최적화
- 자사 또는 전문 OEM을 통한 최종 Prototype 및 시제품 생산 및 규격 최적화

- 기능성 강화 음료 제품개발

- 향산화/피로회복 기능성 시장 동향 및 현황 조사
- 소비자 니즈 및 동향 분석을 위한 캐리어 관련 소비자 기호도/선호도 조사
- 레시피 및 제품 최적화
- 자사 또는 전문 OEM을 통한 최종 Prototype 및 시제품 생산 및 규격 최적화

[제 1협동: 산삼배양근 발효 음료 개발 - 선포식품]

○연구개발의 목표

- 사포닌 함량이 증대된 인삼/산삼배양근 배양기술 표준화
- 특수사포닌 및 그 전구체를 대량 생산할 수 있는 발효공정 표준화.
- 항산화/피로회복/면역 관련 기능성 프로세스 확립
- “백년동안” (B2C 상품 브랜드) 건강 브랜드 및 "Peprich" (B2B 상품 브랜드) 기능성 브랜드를 이용한 제품 및 가공 적성이 뛰어난 기능성 제품 개발

○연구개발의 내용

1. 사포닌 함량 증대 인삼/산삼배양근 배양기술 표준화
 - 사포닌 증대 조직배양 최적화
 - 최적 Growth curve에 따른 생산 표준화
2. 특수사포닌 및 그 전구체 대량 생산 발효공정 표준화
 - 특수사포닌 전환 균주 및 발효 최적화
 - 진세노사이드 전환 프로세스 최적화
 - 진세노사이드 전환율에 따른 발효공정 표준화
3. 항산화/피로회복/면역 관련 기능성 프로세스 확립
 - 기능성 관련 추출, 분리, 정제 기기분석, *In vitro*, *In vivo* 프로세스 구축
4. “백년동안” 브랜드 (B2C), Peprich(B2B) 항산화/피로회복 제품 개발
 - 항산화/피로회복 기능성 시장 동향 및 현황 조사
 - 소비자 니즈 및 동향 분석을 위한 캐리어 관련 소비자 기호도/선호도 조사
 - 관능 평가에 따른 레시피 및 제품 최적화
 - 자사 또는 전문 OEM을 통한 최종 Prototype 및 시제품 생산 및 규격 최적화

[제 2협동: 한국형 미생물을 이용한 발효 홍삼제품개발 - 웅진식품]

○연구개발의 목표

- 발효홍삼을 이용한 기호성 개선 공정개발 및 target 기능형 제품개발

○연구개발의 내용

- 미국, 유럽시장에 발효홍삼제품의 출시 현황 파악 및 선호도 조사를 통한 컨셉 제품 개발 계획 수립
 - 현재 판매중인 제품들의 소재, 용기, 관능, 기능성, 디자인 분석을 통한 target제품 개발
 - 분리된 미생물을 이용하여 발효를 통한 쓴맛 저감공정 개발
 - 추출공정 및 가공기술 개발을 통한 쓴맛 저감화 공정 개발

- 각 공정, 발효진행 정도, 관능별 시제품 개발
- Pilot test를 통한 생산 공정 개발 및 제품 기준규격 확립
- 제품 대량생산 안전성/안정성 검증
- 현장 시생산 및 본생산을 통한 생산 공정 최적화
- 개발소재 원료를 이용한 다양한 컨셉의 제품 type 개발
- 미국, 유럽등지의 정서와 기호에 맞는 용기 개발 및 Brand naming 오디션을 통한 브랜드 개발
- 마케팅 전략수립 및 초기 런칭을 위한 홍보 체계 구축(on-off line 매체 활용)

[제 3협동: 한국형 미생물을 이용한 발효 식물추출물개발 - 한방바이오]

○연구개발의 목표

- 식물 추출물과 한국형 미생물의 혼합 발효를 통해 개발된 고기능성 소재를 이용한 제품 개발

○연구개발의 내용

- 1세부의 연구기술결과물 산업화
 - 식물추출물 표준화 및 최적화
 - 한국형 미생물 이용 발효공정의 확립
 - Scale-up을 통한 표준화 구축
 - 최종 Prototype 시제품 생산
- 기능성 강화 음료 제품개발
 - 향산화/피로회복 기능성 시장 동향 및 현황 조사
 - 소비자 니즈 및 동향 분석을 위한 캐리어 관련 소비자 기호도/선호도 조사
 - 레시피 및 제품 최적화
 - 자사 또는 전문 OEM을 통한 최종 Prototype 및 시제품 생산 및 규격 최적화
- 품질검사를 위한 표준화된 분석법 확립
 - 제품 및 제형별 품질검사 방안 확인

[제 4협동: 한국형 미생물을 활용한 기능성 화장품 원료 및 제품개발 - GFC]

○연구개발의 목표

in vitro 및 임상 시험을 통한 미백기능 활성을 가지는 기능성 성분 표준 제조공정 개발 및 화장품 원료 제품 개발

○연구개발의 내용

- 한국형 신규 미생물 2종을 활용한 기능성 화장품 소재 탐색
- 기능 화장품 원료 소재 제조 표준 공정 확립

- 기능성 화장품 생리 활성 평가
- 1세부와 연계한 기능(지표)성분 규명 및 분리정제 통한 품질관리 분석법 확립

- 1세부 과제와 연계한 한국형 토종 미생물을 이용한 기능성 화장료 개발

- 미생물 배양액을 활용한 기능성분 개발
- 식물 추출물 발효를 통한 기능성분 개발
- In vitro test를 활용한 기능성분의 검정

-화장품 소재 생리활성 평가

- 기능성 물질의 세포실험을 통한 기능성 활성 평가
- 세포독성 평가를 통한 소재의 안정성 검정
- 기능성 물질의 임상시험을 통한 기능성 활성 평가

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

가. 건강기능식품현황

- 2010년도 건강기능식품 생산실적 현황을 분석한 결과, 국내출하액과 수출액을 합친 국내 생산실적이 10,671억원으로 2009년 9,598억원에 비해 11.2%가 증가하였다. 지난해 신종인플루엔자의 대유행으로 인하여 지난해 약 20% 가량의 성장을 한데에 비하면 낮은 수치이기는 하나, 2004년 건강기능식품에 관한 법률 공포 이후 건강기능식품의 생산실적이 집계된 이래 처음으로 1조원 시장에 진입하였다.
- 이에 따라 국내생산실적과 수입실적을 합한 2010년 시장규모 역시 전년 대비 10.24%의 성장을 함으로써 2007년 이후 꾸준한 성장을 지속하고 있는 것으로 나타났다.

(단위 : 천원)

구분	출하액	수출액	국내합계	수입액	총계
2006년	663,719,962	37,139,356	700,859,318	219,393,105	920,252,423
2007년	688,836,608	34,617,532	723,454,140	200,427,532	923,881,672
2008년	751,632,318	51,434,692	803,067,010	288,920,500	1,091,987,510
2009년	918,383,365	41,462,213	959,845,577	243,008,689	1,202,854,266
2010년	1,021,128,112	45,967,144	1,067,095,256	258,962,874	1,326,058,130

자료원 : 식품의약품안전청

<건강기능식품 생산 실적>

- 또한 2010년 생산실적의 경우 상위 10개 품목이 전체실적의 93.2%를 차지하고 있으며 이중 홍삼제품이 5,817억원으로 전체 실적의 54.5%를 차지하여 6년 연속 1위를 차지하였다. 또한 개별인정형 제품의 경우 2009년(800억원)에 비해 41% 가량 증가하여 빠른 성장세를 이어가고 있다
- 고려인삼을 분류하면 수삼, 홍삼, 백삼으로 나누어 지는데, 수삼은 모든 인삼의 원료용으로서 또는 그대로 유통되기도 하나 수삼 자체가 75%내외의 수분을 함유하고 있기 때문에 원형 그대로는 장기적 보존이나 유통이 어려워 오랜 역사를 거쳐 저장수단의 방법으로 일광건조법과 열처리 증숙건조법을 이용하여 왔다. 제조방법에 따라 백삼과 홍삼으로 구분하고 2차 가공되는 제품을 원료에 따라 백삼제품과 홍삼제품으로 다시 구분한다.

- 국민들의 건강기능식품에 대한 관심증대와 고려인삼의 약리효능과 생리활성 성분에 대한 과학적 연구결과가 많이 발표되면서 음용이 편리한 다양한 인삼제품의 소비가 크게 증가하고 있다. 인삼수요의 동향을 보면 인삼의 수요는 계속 증가하고 있으며 1인당 인삼소비량은 1998년 0.19kg에서 1999년 0.27kg으로 급증한 이후 2003년 0.30kg, 2004년 0.27kg, 2005년 0.28kg, 2006년 0.39kg, 2007년 0.41kg, 2008년 0.45kg 2009년 0.48kg으로서 꾸준히 소비하는 것으로 나타나고 있다.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 인삼류별로 살펴보면 2003년 기준으로 전체 수출액에서 홍삼류가 차지하는 비중은 50.2%로 가장 높고 백삼류 37.4%, 기타 12.4% 순이었으나 2006년에는 홍삼류가 62.0%로서 백삼류 33.4%를 능가하였으며 2009년에는 홍삼류가 68%로 증가폭이 큰 것으로 나타나고 있다. 2009년 단일 품목의 비중으로 보면 홍삼이 44.7백만 달러로 최고 수준이고 백삼정 11.1백만 달러, 인삼음료 9.0백만 달러, 홍삼분 13.2백만 달러, 홍삼정 12.3백만 달러, 홍삼조제품 6.9백만 달러, 백삼조제품 5.3백만 달러 순으로 나타났다.
- 인삼류의 수출지역별 실적을 보면 연도에 상관없이 동남아 지역이 84 ~ 87%를 차지하고 있으며 2009년의 경우 동남아가 87%, 북미 8.6%, 유럽 2.2%, 중동 0.6%, 중남미 0.1%를 차지하고 있다. 2009년 수출국가는 총 78개국으로 2000년 63개국보다 15개국이 증가된 것이다. 2009년의 수출국가별 인삼수출현황을 보면 일본이 34.4백만 달러(31.7%), 홍콩이 27.9백만 달러(25.7%), 대만이 16.0백만 달러(14.7%)로서 전체의 72.1%를 차지하고 있어 수출지역이 너무 일부국가에 편중되어 있음을 알 수 있으며 수출국가의 다원화가 절실히 요구되고 있다.
- 식품의약품안전청의 식품 및 식품첨가물 생산실적 통계자료에 따른 인삼 제품류의 연도별 국내용과 수출용으로 구분한 출하액 추이를 보면 표11과 같다. 백삼류와 홍삼류를 합산한 국내 출하액은 2001년 1,746억원 수준에서 2004년 2,575억원으로 증가하였고 2007년에는 3,370억원으로 급증하였으며, 수출액은 2001년 3,286만달러에서 2004년 2,891만달러로 거의 반감하였고 2001년부터 급증하기 시작하여 2003년에는 4,014만달러로 증가하였으나 2004년에는 2,890만달러로 급격히 감소하였고 2007년에는 1,790만달러로 감소하는 추세에 있다.

나. 기술 분석

1) 특허분석 측면

- 기존 특허는 인삼 사포닌의 전환에 대해 실험실 스케일에서의 단순한 방법적인 분야에 치중되어 있으며 실제 그 효율 또한 높지 않으며 생성된 일부 물질에 대한 TLC 및 HPLC를 통한 분석을 하는데 그치고 있다. 따라서 본 연구과제에서는 유용균주의 선발을 통한 사포닌 전환시 이용되는 최적의 조건을 탐색하고 효소의 활성 증가를 위한 elicitor 탐색을 통한 유용물질 생산의 최적화를 모색하며 이를 대량 생산하기 위한 scale up을 하는 방향으로 연구를 추진하여 특허 출원을 할 계획이다.

2) 논문분석 측면

- 유산균의 경우 국내 외를 막론하고 신종의 균주를 찾기가 매우 어려운 상황이다. 이는 기존의 미생물의 연구가 유산균을 중심으로 이루어져 비교적 다른 균주들에 비하여 많은 연구가 수행되었기 때문으로 사료된다. 하지만 본 연구팀에서는 이미 2종의 유산균 신균을 개발하여 현재 논문 및 특허를 보유하고 있고 신규 유산균주를 3종 이상 확보하고 있어 이를 활용한다면 충분히 차별화된 논문을 게재 할 수 있을 것으로 판단된다.
- 기존 논문은 균주의 선발을 통한 인삼사포닌의 전환하는데 목적을 두고 있다. 실제 인삼전환을 위해 토양미생물, 유산균등 다양한 균주를 이용하여 사포닌과 반응시켜 minor 사포닌으로 전환하는 분야에 치중되어 있다. 더불어 대분의 연구가 다양한 ginsenoside의 전환 및 생리활성을 확인하는 것이 아니라 PPD계열의 ginsenoside C-K의 생산에 치우쳐 있어 다른 사포닌 성분에 대한 전환 연구는 미미한 수준으로 PPD계 뿐만 아니라 PPT계열의 대사물질 분석을 통한 검정에 대한 연구를 추진하여 국제학술지에 게재할 계획이다.
- 최근 발표된 논문은 단순히 많은 양의 균주를 키워 효소를 뽑아 단일 물질과 반응시켜 극소량의 minor사포닌을 생산하기에 실제적으로 이는 산업화에 적합하지 않다. 따라서 본 연구과제에서는 실제 인삼을 비롯한 다양한 식물 추출액 및 신규 유산균주를 이용한 균주생장배지조성의 개발 및 반응 통하여 다양한 대량생산을 위한 연구를 수행하여 국제 학술지에 게재할 계획이다.

3) 제품 및 시장분석 측면

- 발효제품의 시장 현황 : 최근 식물 및 미생물의 주요성분을 상업적으로 이용하려는 시

도가 계속 되고 있다. 특히, 식물의 유용물질을 물리, 화학적, 미생물, 효소적인 방법 등을 통하여 고기능성 물질로 전환 하는 연구가 이루어지고 있다. 그러나 물리, 화학적 방법의 부반응 및 환경오염등의 다양한 문제점이 대두됨에 따라 최근에는 미생물을 이용한 발효연구에 관심이 급증되고 있는 실정이다. 이에 따라 다양한 기업에서 발효 제품을 출시 하고 있으며 실제 CJ, 대상, 웅진 등의 대기업들이 발효홍삼 및 발효 기능성 제품을 출시하고 있으며 중견 기업들로 점차 확대되어 나가는 추세이다. 그러나 기존의 제품은 기존의 균주를 활용하거나 상업적 효소를 이용함으로써 원천적 기술을 확보하지 못하고 있으며 일부의 경우 해외의 균주를 수입하여 사용하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서 개발한 한국형 토종 유산균을 이용하여 원천적 기술을 개발하고 이를 차별화요소로 활용한다면 충분한 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 사료된다. 더불어 시중의 제품이 발효를 통한 물질에 대한 구체적인 명시가 되어 있지 않는데 반하여 본 연구과제에서는 홍삼의 발효를 위한 사용 유용균주 및 발효방법의 정확한 기준을 마련하고 HPLC 및 LC/MS 정성 및 정량 분석을 통한 신규 전환 물질의 표준화를 이룩할 것이며 더불어 이들 성분이 증강된 기능성식품 및 천연물 신약개발을 위한 소재개발에 크게 기여할 것으로 기대된다.

다. 국내 인삼산업 현황 및 문제점

1) 국내 인삼 생산 현황

- 홍삼이 총 44.4%, 백삼이 4.1%, 태극삼이 0.4%의 비율로 생산되고 있으며 수삼으로 사용된 것이 51.0% 차지하고 있다. 그러나 수삼의 경우 거의 내수시장에 한정되어 있으며 수출은 거의 없는 상태이다. 대부분의 수삼 및 인삼 가공 제품(홍삼, 태극삼 등)이 내수 중심으로 판매 되고 있는 실정이다.

표. 국내인삼의 내수 수출현황

구 분	생산량	가공 및 제품형태 (톤)		
		전 체	내 수	수 출
홍 삼	11,596톤 (44.4%)	뿌리삼 가공 3,711 (32.0%)	2,943 (79.3%)	768 (20.7%)
		가공 제품류 7,885 (68.0%)	7625(96.7%)	260(3.3%)
태극삼	104톤 (0.4%)	104 (100%)	72(68.1%)	34(31.9%)
백 삼 용	1,068톤 (4.1%)	뿌리삼 가공 591(55.3%)	509(86.1%)	82(13.1%)
		가공제품류 477 (44.7%)	394(82.6%)	83(17.4%)
수 삼 용	13,289톤 (51.0%)	뿌리삼 생산(100%)	13,289톤 (100%)	-
계				

- -자료 : 농림수산식품부 인삼통계자료.

2) 인삼 수출 동향

- 우리나라의 인삼 수출은 1990년 164.9백만 불로 정점으로 더 이상 늘어나지 않고 오히려 계속 하락하여 1999년에는 미화 8,400만 달러로 1990년의 50%수준까지 감소함.
- 2000년대 이후 점차 회복세를 보여 2013년 173백만 불로 전년 대비 16% 증가하였음
- 2012년 기준 홍삼류가 전체 수출의 70%를 차지하고 있으며, 홍삼류 중 원형삼이 62%로 편중되어 있고, 홍삼정이 12%, 홍삼조제품이 20%로 아직까지도 원형삼 중심의 저부가가치 중심의 수출 구조임
- 반면, 백삼을 비롯한 태극삼(전체 수출의 0.4%)은 20% 이하로 수출시장에서 경쟁력을 잃어버린 상태임
- 따라서 인삼 수출의 경쟁력을 확보하기 위해서는 원형삼 중심의 수출구조를 탈피하여, 다양한 형태의 고부가가치 제품 개발, 수출국 대상 현지 맞춤형 제품 개발, 홍삼 이외의 제품 개발이 필요함

표. 인삼류의 연도별 수출액

품목	'10		'11		'12	
	수량	금액	수량	금액	수량	금액
계	3,298	124,204	3,712	189,346	4,379	151,012
◦ 홍삼류	1,489	86,457	1,642	149,933	1,500	104,128
- 홍 삼	173	52,695	345	108,405	193	65,100
- 홍삼정	203	10,408	206	12,362	213	13,942
- 홍삼분	80	12,233	83	14,354	25	4,888
- 홍삼조제품	1,033	11,121	1,008	14,812	1,069	20,198
◦ 백삼류	517	26,418	374	26,117	396	28,252
- 백 삼	68	9,514	50	8,480	57	10,913
- 백삼정	50	9,337	56	9,110	41	8,167
- 백삼분	94	1,961	26	2,182	15	1,692
- 백삼조제품	305	5,605	242	6,345	283	7,480

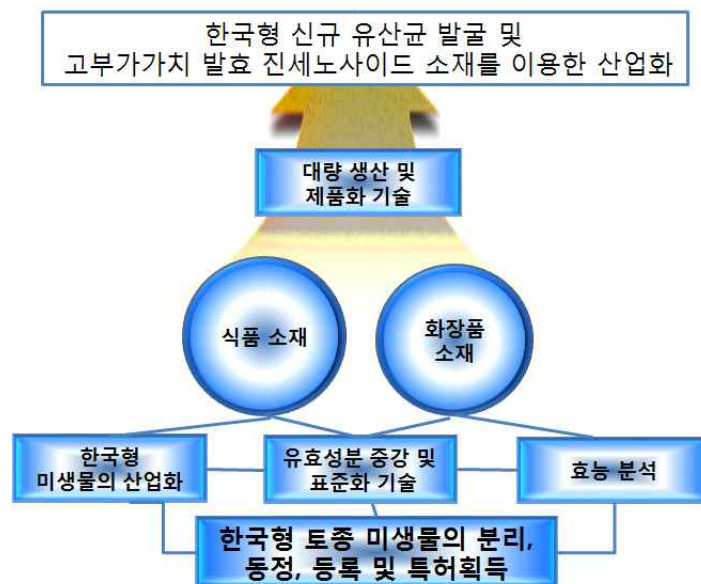
- 지역별 수출실적을 보면 아시아, 북미, 중남미의 순으로 중국, 대만 일본 등 아시아가 전체 시장의 50%를 차지하고 있어 이들 시장은 이미 인삼에 대해 꾸준한 수요가 있으므로, 현지인들의 수요에 맞는 맞춤형 효능 제품, 소비자 지향의 기호도 및 제형 개선을 통한 수출시장 확대를 전망할 수 있다.

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-07
------	------

인삼은 우리나라를 대표하는 약용작물로 Ginsenoside라고 불리는 인삼 사포닌이 주요 약리성분으로 잘 알려져 있다. 이들 인삼 사포닌은 인삼 내에 대다수가 고분자 형태의 major 사포닌 형태로 존재하고 있으며 이들 사포닌은 인삼을 경구투여 시 major 인삼 사포닌의 생체 내에서의 흡수는 아주 낮다는 것이 다양한 연구를 통하여 밝혀 졌다. 인삼의 대표적인 major 사포닌인 Ginsenoside Rb1, Rb2는 위에서 위액에 의해 극소량이 oxygenation 되는 외에 대체로 흡수되기 어렵고(Karikura et al., 1991a) 대부분은 노액에 의해 체외로 배설되며 소량이 장내세균에 의해 compound K로 분해되어 혈액에 흡수 된다(Akao et al., 1998a; 1998b)고 보고되면서 major 인삼 사포닌보다 분자량이 작고 더 흡수되기 좋은 minor 사포닌 Rg3, Rg2, Rh2, Rh1, compound K의 생산과 약리활성에 관한 연구가 본격적으로 진행되었다. 이렇듯 최근에는 미생물이나 효소를 이용하여 배당체화 하는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 이러한 방법으로 전환된 인삼 사포닌은 다양한 제품으로 개발되어 건강기능성 식품, 의약품 및 화장품 등 다양한 분야에서 각광받고 있다.

하지만, 미생물 및 이들을 이용한 효소의 경우 대부분 해외의 미생물 유전자원을 활용하여 활용하고 있는 경우가 대다수이며, 많은 연구에 비하여 그 효율성 또한 높지 않은 것이 현실이다. 따라서 본 연구팀에서는 다양한 균주들을 자체적으로 활용하여 원천적 유전자원을 확보하여 국제적 경쟁력을 확보하고자 한다. 이와 더불어 이들을 활용하여 보다 효율적인 사포닌 전환을 유도 할 수 있는 연구기술을 개발을 통한 실질적으로 산업에 이용가능 할 수 있는 활용방안을 확립하고자 본 연구를 수행하였다.



<그림> 본 과제의 핵심 목표

1절. 새로운 한국형 유용미생물의 분리 및 동정

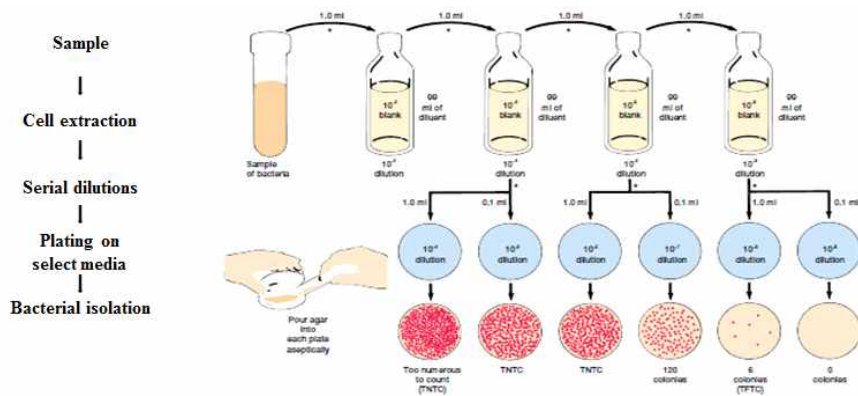
[개요]

- 유용 미생물의 분리를 통하여 고유의 원천 유전자원을 확보하고자 함.
- 분리 미생물 중 인삼의 사포닌을 전환 할 수 있는 활성을 가진 균주를 확보하고자 b-glucosidase 활성 균주를 screening을 계획 함.
- 확보 균주의 16s rDNA sequencing을 통한 검증을 통해 동정하고, 신규 균주의 경우 분류학 연구를 통하여 신종 균주로서 국제적인 인증을 받고자함.

1. 한국형 미생물의 분리

가. 발효식품 등의 균주를 분리하기 위한 시료를 수집하여 내용물 전체를 마쇄 한 후에 멸균된 튜브에 넣어 샘플을 수집하였다.

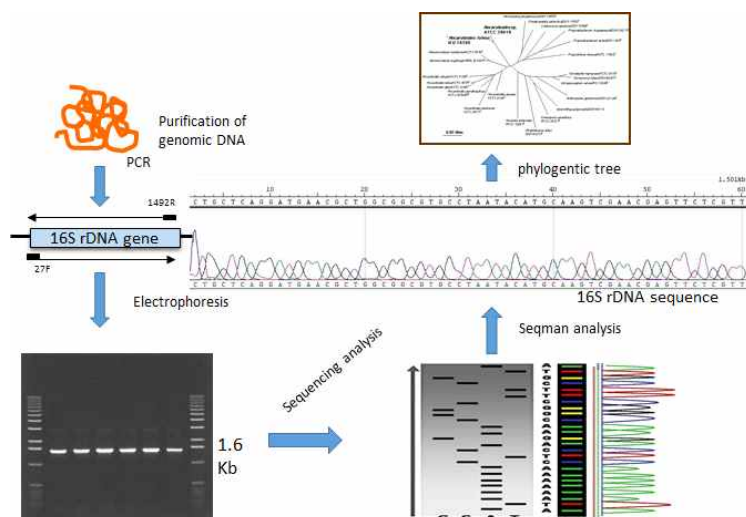
나. 수집한 시료를 멸균수로 $10^{-1} \sim 10^{-3}$ 희석하고 MRS agar plate에 100μ 1 씩 smear한 후 30°C 에서 24시간 배양하여 유산균을 분리하였다. 배지 상에 나타난 서로 다른 색상, 형태를 가진 균주들을 1차로 선별한 후 2~3회의 계대배양을 거쳐 단일 균주로 확인된 균주들을 선별하였다.



<그림> 균주의 순수 분리 모식도

다. 각각 균주를 MRS 배지를 사용하여 30°C , 190 rpm에서 현탁 배양하였다. MRS broth에서 O.D600 값 1.0되게 배양한 후 1 mM ginsenoside Rd와 1:1 (v/v)의 비율로 혼합하고 30°C , 190 rpm에서 72시간 반응시켰다. 동량의 수포화부탄올로 추출하고 TLC plate에 점적하여 전환여부를 확인하였다. 점적한 TLC plate를 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:35:10, v/v/v, 하층) 혼합용매로 5.5 cm 전개한 후 10% H_2SO_4 를 분무하여 가열을 통해 발색시켰다.

라. 사포닌 전환 활성이 있는 균주를 선발하여 이를 동정하기 위하여 DNA 추출과 16S rRNA sequencing을 수행하였다. 전체 염색체 DNA는 GenAll의 genomic DNA extraction kit를 이용하여 추출하고 분리되었다. 추출된 16S rRNA 유전자의 증폭은 3가지의 universal bacterial primer들(27F, 518F, 1492R)에 의해 실행되었다. 증폭된 유전자의 염기 서열분석은 Phred/Phrap program을 사용하는 Applied Biosystems 3730xl DNA analyzer의 Big Dye terminator 방식으로 수행되었다.



<그림> 한국형 미생물의 동정을 위한 16s rDNA sequencing

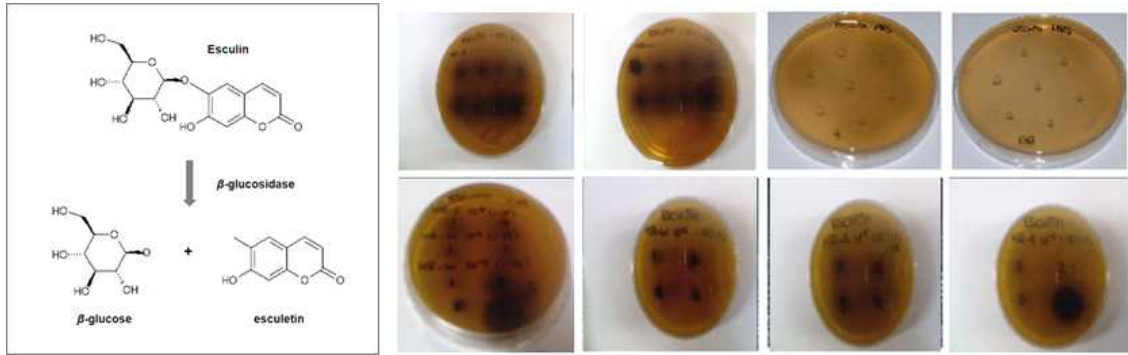
마. 분석된 16S rRNA contig들은 SeqMan software (DNASTAR Inc.)를 이용해 하나의 염기서열로 종합한 후, Genbank와 EzTaxon(<http://www.eztaxon.org>; Chun *et al.*, 2007)의 BLAST program을 이용해 상동성을 조사하였다. BLAST 결과, 관련된 type strain들의 염기서열을 EzTaxon으로부터 수집하여 BioEdit (Hall, 1999)를 이용해 편집하였고 염기 서열들의 다중정렬은 Clustal X program (Thomson *et al.*, 1997)에 의해 수행되었으며 Type strain들 간의 진화적 거리는 Kimura 2 parameter model (Kimura *et al.*, 1983)을 이용해 계산되었다. 계통발생학적 지도는 MEGA 4.0 프로그램 (Tamura *et al.*, 2007)에서 bootstrap을 1000번 반복하도록 설정하여 (Felsenstein *et al.*, 1985) neighbor-joining method (Saitou *et al.*, 1987)와 maximum-parsimony method (Fitch *et al.*, 1971)에 의해 구축되었다.

2. 사포닌 전환을 위한 β -glucosidase 활성 균주 선발

균주 분리에 사용한 시료는 국내의 발효 식품과 인삼 근권의 토양을 이용하였으며, 이로부터 각각 유산균 및 토양 미생물을 분리하고자 하였다. 가정집 및 음식점에서 담근 김치와 인삼 근권의 토양을 각각 분리원으로 활용하였다. 본 연구에서는 주로 식품 및 화장품 소재로의 활용가치를 더하고자 주로 유산균을 사용하고자 하였으며, 이에 따라 유산균을 분리하였다. 유산균 분리에 사용한 시료는 가정집 및 음식점에서 담근 김치 및 발효식품을 수집하여 분리원으로 사용하였으며, 각 시료들을 멸균증류수로 $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 으로 희석한 후 MRS agar 배지에 100 ul 씩 도말하여 37°C incubator에서 배양하였다. 균주는 모양, 색, 투명도, 크기, 외형구조 등을 육안으로 관찰하여 선발하였으며 선발한 균주는 MRS agar 배지에 streaking 하여 4회 계대배양하여 single colony를 순수 분리하였다. 순수 분리된 균주는 20% glycerol stock solution을 만들어 -70°C deep freezer에 보관하였다. β -glucosidase 활성을 갖는 균주의 선발을 위해 esculin agar 법(Atlas, 1993)을 이용하여 esculin이 함유된 esculin 배지에 접종하여 배지 내에서의 색깔 변화를 관찰하였다. Esculin은 β -glucosidase에 의하여 glucose와 esculin으로 분리되며 esculin은 ferric ammonium citrate와 반응하여 colony주위에 black complex를 형성하게 된다. 따라서 colony주위에 black complex를 형성하는 균주를 β -glucosidase 활성을 가지는 균주로 판단하였다.

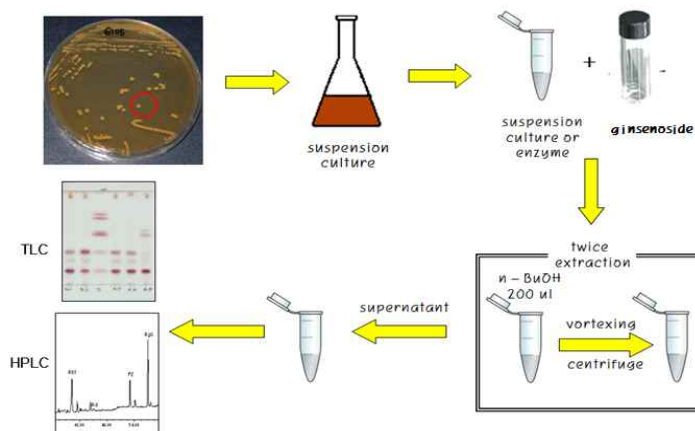
<표> 미생물 분리에 이용한 배지 (MRS)

Components	Concentration (g/L)
Pancreatic digest of casein (Casamino acids)	13.0
NaCl	5.0
Yeast extract	5.0
Heart muscle, solids from infusion	2.0
Esculin	1.0
Ferric ammonium citrate	0.5
Agar	15.0



<그림> esculin을 이용한 β -glucosidase 활성 균주의 선발

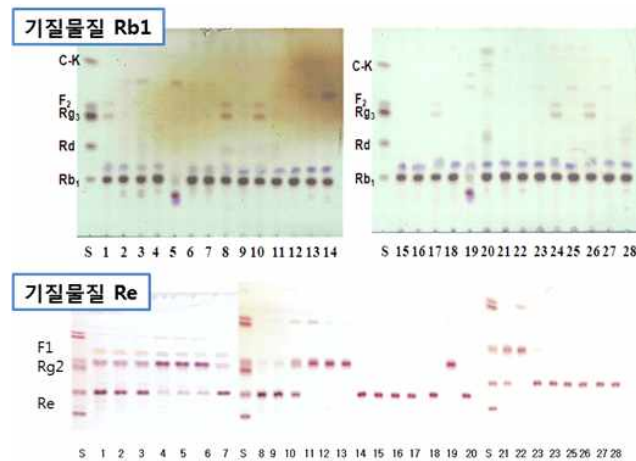
β -glucosidase 활성을 가진 균주를 기본적으로 ginsenoside와 반응 시켜 이들 균주가 실제 인삼 ginsenoside을 전환시킬 수 있는 능력이 있는지에 대하여 검정 하였으며 ginsenoside 전환 활성이 있는 균주만을 선발하여 이를 동정하였다.



<그림> 분리 균주와 인삼 사포닌과의 반응 모식도

먼저, 균주를 각각 최적 배양 조건을 이용하여 배양한 후 이의 배양액을 이용하거나 배양으로부터 효소를 추출하여 인삼 ginsenoside와 반응 하였다. 효소를 추출할 때에는 acetone 침전법을 이용하여 단백질을 침전한 후 이를 다시 buffer에 녹여 조효소로서 활용하였다. 인삼 ginsenoside과의 반응 시, 37°C에서 5일간 반응 시킨 후 반응액에 부탄올을 첨가하여 ginsenoside 분획을 얻어 이를 TLC 혹은 HPLC를 활용하여 분석을 하였다. Esculin agar 법을 이용하여 glucosidase 활성이 있는 것으로 확인되어진 각각의 28개의 균주를 각각 인삼 ginsenoside에 반응 시켜 이를 확인해 본 결과 특이적으로 ginsenoside와의 반응을 통해 minor ginsenoside으로의 전환이 확인

되었다. 이들 균주는 다른 균주에 비하여 비교적 ginsenoside 전환 활성이 강한 것으로 확인 된 바 본 연구에서는 이들 균주 중 본 과제 목적에 부합하는 minor ginsenoside를 생산하는 균주를 선발 하여 후속 연구를 진행 하고자 하였다.



<그림> 분리 균주와 인삼 사포닌과의 기질별 반응결과 TLC

3. 분리 균주의 16s rDNA sequencing을 통한 동정

분리 균주의 16S rRNA gene sequencing은 제노텍에 의뢰하였으며, NCBI data base를 이용하여 분리된 균주와 type strain의 similarity(%)를 확인하였다. 균주들의 16S rRNA 염기서열을 Clustal X program(Thompson *et al.*, 1997)을 이용하여 일정하게 정렬하고, gap는 BioEdit program으로 편집하였다. 균주들의 진화과정을 추적하는 작업은 Kimura two-parameter model(Kimura, 1983)을 이용하였으며, MEGA 3 Program(Kumar *et al.*, 2004)의 neighbor-joining(Saitou & Nei, 1987)방법으로 계통분류학적 위치를 결정하였다. 16s rDNA를 통한 동정 실험 결과 각각의 시료로부터 총 약 100여개의 균주를 분리하였으며, 그중에서 9개의 한국형 신종 미생물과 인삼사포닌을 분해 할수 있는 특이적 활성을 가진 5종의 균주를 분리하였음을 확인 하였다. 신종으로 확인된 균주들은 모두 최초로 분리하여 새롭게 종을 명명하였으며 특히, 2개의 유산균 신종을 추가로 확보하여 이를 각각 *Lactobacillus kyungheensis* sp. nov., *Leuconostoc kyungheensis* sp. nov로 명명 하였다. 유산균은 최근 식품 및 의약품, 화장품 소재로 주목 받고 있지만 원천 미생물을 외국에서 수입하여 쓰고 있는 실정으로 이들 새로운 한국형 유산균들이 기존의 미생물 대체제로서의 이용가치가 높을 것으로 기대된다.

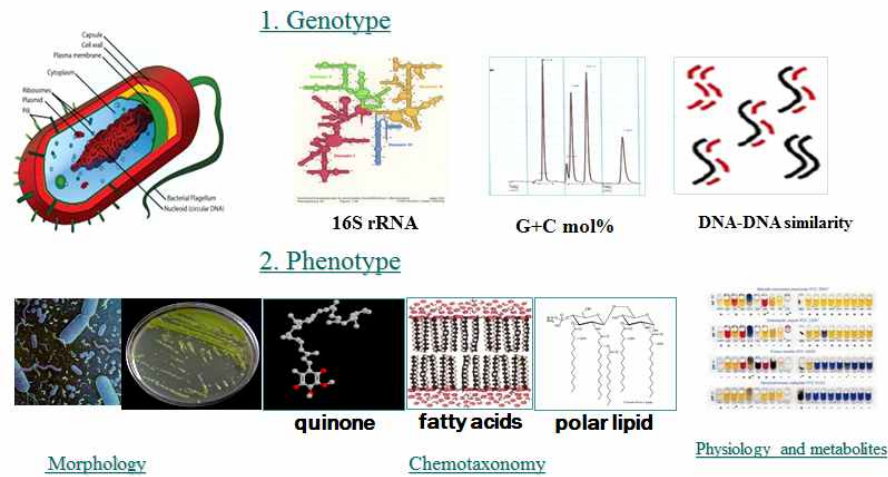
<표> 새롭게 분리 되어진 한국형 미생물 신종 균주 후보군

No	Phylum	Class	Order	Family	Type strains
1	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Chryseobacterium yeoncheonense sp. nov.</i> ,
2	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Chryseobacterium ginsengiterrae sp. nov</i>
3	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Brachybacterium ginsengisoli sp. nov</i>
4	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Humibacter ginsengisoli sp. nov</i>
5	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Humibacter soli sp. nov</i>
6	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	<i>Flavobacteriales</i>	<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Epilithonimonas ginsengisoli sp. nov</i>
7	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Arthrobacter gyeryongense sp. nov</i>
8	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus kyungheensis sp.nov.</i> ,
9	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Leuconostoc kyungheensis sp. nov</i>

4. 신종 한국형 유산균의 등록을 위한 분류학 연구

2종의 신규 유산균을 포함한 총 9종의 신규 한국형 미생물을 국제적으로 등록하기 위하여 미생물 특성 검정을 통한 동정 연구를 수행하였다. 화학과 분자생물학에서의 신뢰할만한 분석 기법들의 발달은 전통적인 미생물학적 실험들에 대한 의존도를 감소시켰다. 화학분류학적 분석법이 대표적이며, 이는 세포벽의 peptidoglycan 구조나 세포의 지방산 조성, isoprenoid quinone의 유형과 같은 세포의 화학적 표지를 바탕으로 하는 분류법의 하나이다(Collins *et al.*, 1979; Goodfellow *et al.*, 1980). 이 방법은 모든 계통 단계에 적용될 수 있으며, 속 단위의 분류에 매우 유용하다. 하지만 화학분류학적 분석법이 갖는 단점은 미생물의 화학적 조성이 환경의 영향을 받아 변한다는 것이다. 따라서 화학적 조성을 기초로 미생물을 비교할 때는 환경에 의한 것인지 유전적 차이에 의한 변화인지를 관찰하는 것이 중요하다. 예를 들면, 미생물의 배양은 동일한 환경적 조건과 동일한 성장 주기에서 이루어져서 환경적 영향을 받지 않았음을 확인해야 한다. 분자 계통학은 미생물의 유전적인 특성을 결정짓는 것이 DNA로 밝혀지고, 이에 따라 DNA 염기 조성 및 DNA-DNA hybridization 같은 분석법들의 사용과 함께 시작되었다. 최근에는 rRNA가 계통발생학적 관계를 연구하는데 있어 최적의 표적이라는 사실이

일반적으로 받아 들여 지고 있으며(Woese, 1987), 가장 큰 장점은 환경적 영향에도 그 조성의 변화가 없다는 점이다. 그렇기 때문에 DNA를 비롯한 핵산을 이용한 분자 계통학은 광범위한 미생물의 비교와 분류를 함에 있어 유일한 표준 분자 물질로 평가받고 있다.



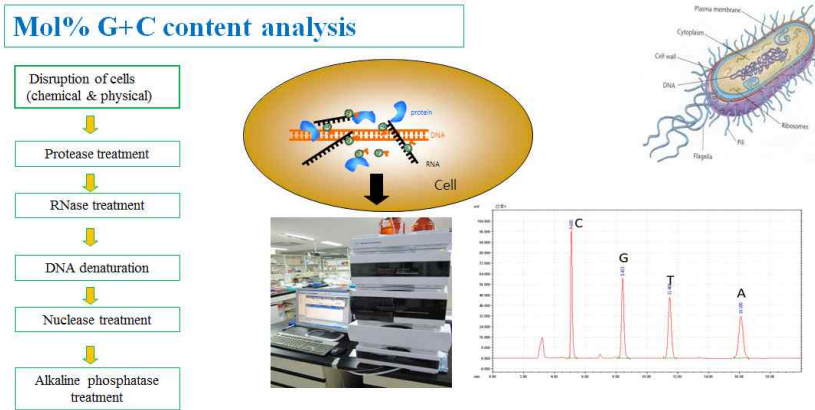
<그림> 분류학적 연구를 통한 신종 미생물의 동정

이처럼 최근에는 분자 생물학 분야의 급격한 발달과 함께 유전자 분석 기술이 용이해 지면서 분자 계통학적 분석 기법이 미생물의 분류, 동정을 위해 많이 사용되고 있다. 전통적으로 사용되던 형태학적, 생리 생화학적 특징에 의존한 분리 및 동정 방법들에 대한 의존도가 낮아지고 있지만 여전히 전통적인 방법들과 더불어 세포의 화학적 조성을 이용하는 화학 분류학적 방법, 분자계통학적 분석을 병행하는 통합된 분류 및 동정 방법이 가장 정확하고 객관적인 방법으로 평가 받고 있다.

① Genomic DNA의 G +C 함량(mol%)

Genomic DNA는 Genall genomic DNA extraction kit를 이용하여 추출 · 분리하였고 nuclease P1 효소를 이용해 각각의 nucleoside 함량을 측정하였다 (Mesbah *et al*, 1989; Tamaoka & Komagata, 1984). 10 μg의 DNA를 포함하고 있는 10 μl의 용액을 끓는 물에서 5분간 가열 후 냉각시킨다. 열에 의해 변성된 DNA에 nuclease P1 용액 (20 U/ml)을 10 μl 넣어 섞어주고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 alkaline phosphatase (1 U/ml)을 10 μl 넣고 37°C에서 3시간 동안 반응시켰다. Nucleoside 혼합물은 C₁₈ reverse phase column에서 0.2 M ammonium phosphate: acetonitrile (40:1 v/v)의 혼합물을 용매로 하여 0.7 ml/min의 유속으로 270nm의 UV 흡광도에서

HPLC를 이용해 분석하였다.



분리된 미생물 대하여 각각의 type strain과의 G+C contents 비교를 위하여 균주를 배양한 후 이의 genomic DNA를 추출하고 이를 enzyme을 통해 nucleotide 단위로 절단하였다. 이를 다시 HPLC 분석을 통해 샘플에 함유된 G+C 함량을 측정 하였다. 그 결과, 기존에 보고된 type strain과 차이가 있어 신종 미생물임을 증명할 수 있는 data로 확보 하였다.

② DNA-DNA hybridization

DNA간의 혼성화 실험은 형광분석법에 의해 수행되었다 (Ezaki *et al.*, 1989). 실험은 각 시료 당 5번의 반복구로 수행되었으며 가장 높고, 가장 낮은 값은 제외시키고 남은 3개의 값을 평균값으로 산출해냈다. 분리 되어진 한국형 신종 미생물 중 16s rDNA 차이가 적었던 일부 균주를 대상으로 DNA-DNA hybridization을 실시 한 결과 일반인 통계로 분류학에서 16s rDNA상 97%에서 98%의 similarity를 가진 경우 약 80~90%의 확률로 신종으로 확인 되지만 보다 명확한 비교 확인을 위해 type strain과의 비교 실험을 수행하였다. DNA-DNA hybridization 의 경우70% 미만의 similarity percent를 가질 때 신종으로 판단하며 본 연구에서는 16s rDNA상 차이가 적었던 3개의 균주를 대상으로 본 실험을 실시 하였다. DNA-DNA hybridization을 실시한 결과 모든 균주에서 70% 미만의 상동성을 가지는 것으로 확인되어 분리된 한국형 미생물이 모두 신종에 속함을 확인 할 수 있었다.

DNA - DNA hybridization results

Strains	DCY67 ^T
<i>Ch. ginsenosidimitans</i> THG 15 ^T	11.2 ± 0.6 %
<i>Ch. soldanellicola</i> PSD1-4 ^T	55.1 ± 0.6 %
<i>Ch. piperi</i> CTM ^T	39.6 ± 0.4 %

Strains	DCY80 ^T
<i>B. faecium</i> DSM 4810 ^T	46.9 ± 0.5 %
<i>B. paraconglomeratum</i> KCTC 9916 ^T	28.9 ± 0.6 %
<i>B. saurashtrense</i> DSM 23186 ^T	20.4 ± 0.9 %
<i>B. conglomeratum</i> KCTC 9915 ^T	17.3 ± 0.4 %

Strains	DCY72 ^T
<i>Arthrobacter ramosus</i> CCM 1646 ^T	12.9 ± 0.3 %
<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1 ^T	25.6 ± 0.3 %
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> DSM 420 ^T	26.6 ± 0.5 %
<i>Arthrobacter aurescens</i> DSM 20116 ^T	23.2 ± 0.9 %

결론적으로 본 연구에서는, 인삼 사포닌에 내성을 가지는 새로운 유용균주를 지속적으로 분리 동정하였으며, 이들 균주는 인삼 사포닌을 전환하는데 큰 효과를 가지고 있어 산업적으로 유용하게 적용 될 수 있을 것으로 기대 되었다. 특히, 최근 나고야 의정서 발효에 따라, 대다수의 미생물자원을 수입해서 이용하는 국내 산업의 경우 기존 로열티 이외에 추가적인 이익분배에 의한 수익률 감소등의 문제점을 가지고 있어, 국내 고유의 유전자원에 대한 중요성이 강조되고 있다. 이에 본 연구팀에서는 개발한 균주를 분류학적으로 인정받아 우리나라의 소재로 활용하고자, 이의 분류학적 동정 연구를 수행을 통하여 자체적으로 활용할수 있는 유전적 원천자원을 인정받고자 하였다.

<표> 유용물질 생산 활성 활용가치가 있는 한국형 미생물의 발굴

특히, 본 연구에서 이용하고자 하는 인삼 사포닌 등 식물의 이차대사산물을 전환 시키는 특성을 가진 균주 중에서도 분류학적으로 가치가 있고 이들을 국제 인증 (validation) 시킬 수 있는 신종제안을 하면 대한민국의 공인 자산으로 인정받을 수 있기에 앞으로의 자원전쟁에서 한 점이라도 선 취득할 수 있는 유리한 고지를 가질 수 있

분리 균주명	신종 등록	비고
<i>Paenibacillus ginsengiterrae</i> sp. Nov., DCY89	○	사포닌 전환 활성
<i>Cupriavidus yeoncheonense</i> sp. Nov.,	○	사포닌 전환 활성
<i>Arthrobacter ginsengisoli</i> sp. Nov.,	○	사포닌 전환 활성
<i>Microbacterium panaciterrae</i> sp. Nov.,	○	사포닌 전환 활성
<i>Sphingomonas panacis</i> sp. Nov.,	○	사포닌 전환 활성
<i>Lactobacillus vespulase</i> sp. Nov.,	○	사포닌 전환 활성
<i>Lactobacillus panaxibrevis</i> sp. Nov., DCY65	등록 중	산포닌 전환 활성, 신규 사포닌 생성 활성
<i>Leuconosotc Kyungheensis</i> sp. Nov.,	등록 중	사포닌 전환 활성
<i>Lactobacillus rossiae</i> DC05	신규 strain	사포닌 전환 활성
<i>Microbacterium esteraromaticum</i> GS514	신규 strain	사포닌 전환 활성
<i>Weissella. hellenica</i> DC06	신규 strain	사포닌 전환 활성

게 된다. 본 연구팀은 2차년도 연구를 통하여 미생물 분류학적으로 신종으로서 활용가치가 있는 총 8개의 균을 선정하여 신종으로 제안하였으며 이중 6개의 균주를 국제적으로 신종으로 인정 받았다. 총 8개의 한국형 신종 미생물을 분리 하였음을 확인 하였다. 이들 균주들은 모두 최초로 분리하여 새롭게 종을 명명하여 미생물 분류학 논문 게재를 통해 신규 균주임을 국제적으로 인증 받았다. 특히, 유산균 신종을 추가로 확보하였으며, 유산균은 최근 식품 및 의약품, 화장품 소재로 주목 받고 있지만 원천 미생물을 외국에서 수입하여 쓰고 있는 실정으로 이들 새로운 한국형 유산균들이 기존의 미생물 대체제로서의 이용가치가 높을 것으로 기대된다.

Paenibacillus ginsengiterrae sp. nov., a ginsenoside-hydrolyzing bacteria isolated from soil of ginseng field

Md. Amdadul Haq · Yeon-Ju Kim · Van-An Hoang · Muhammad Zubair Siddiqi · Deok-Chun Yang

Received: 12 September 2014 / Revised: 5 December 2014 / Accepted: 6 December 2014 / Published online: 17 December 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract A novel bacterial strain DCY89^T was isolated from soil sample of ginseng field and was characterized using a polyphasic approach. Cells were Gram-reaction-positive, rod-shaped, spore-forming and motile with flagella. The strain was aerobic, esculin and starch positive, catalase- and oxidase-negative, optimum growth temperature, and pH were 25–30 °C and 6.0–7.5, respectively. On the basis of 16S rRNA gene sequence analysis, strain DCY89^T was shown to belong to the genus *Paenibacillus* and the closest phylogenetic relatives were *Paenibacillus cellulosilyticus* KACC 14175^T (98.2%), *Paenibacillus kobensis* KACC 15273^T (98.1%), *Paenibacillus xylanolicus* KCTC 13719^T (96.9%), and *Paenibacillus cutlanolobus* KCTC 3759^T (96.6%). The DNA G+C content was 52.5 mol%, and the predominant respiratory quinone was

MK-7. The major fatty acids were iso-C_{15:0}, iso-C_{16:0}, and anteiso-C_{17:0}. The major polar lipids were diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylglycerol. The results of the genotypic analysis in combination with chemotaxonomic and physiological data demonstrated that DCY89^T represented a novel species within the genus *Paenibacillus*, for which we propose the name *Paenibacillus ginsengiterrae*. The type strain is DCY89^T (JCM 19887^T = KCTC 33430^T).

Keywords *Paenibacillus ginsengiterrae* · Ginseng soil · Taxonomy · Biotransformation

Introduction

The members of the genus *Paenibacillus* are either Gram-reaction-positive or Gram-reaction-negative (Ash et al. 1993; Valverde et al. 2008), facultatively anaerobic or strictly aerobic, produced ellipsoidal spores, non-pigmented, rod-shaped, and motile (Lim et al. 2006; Zhou et al. 2012) with a G+C content 39–59 mol % (Yoo et al. 2014). The genus *Paenibacillus*, which belongs to the family *Paenibacillaceae*, is a novel group of bacilli first described by Ash et al. (1993). This genus currently comprises 149 species and 4 subspecies (<http://www.bacterio.ict.fr/paenibacillus.html>). Members of genus *Paenibacillus* are widespread microorganisms commonly isolated from various sources, including food (Berge et al. 2002), fresh water (Baik et al. 2011), air (Rivas et al. 2005), human blood (Roux and Raouf 2004), heat-treated milk (Scheldeman et al. 2004), necrotic wounds (Glaeser et al. 2013), warm springs (Saha et al. 2005), and rhizospheric soil (Cheong et al. 2005). The cell wall peptidoglycan diamino acid of the *Paenibacillus* members is *meso*-DAP.

Communicated by Erko Stackebrandt.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain DCY89^T is KP191579.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00203-014-1073-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. A. Haq · Y.-J. Kim (✉) · M. Z. Siddiqi · D.-C. Yang (✉)
Graduate School of Biotechnology and Ginseng Bank, College of Life Science, Kyung Hee University, Suwon-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea
e-mail: yeonjukim@khu.ac.kr

D.-C. Yang
e-mail: deokchunyang@yaboo.co.kr

Y.-J. Kim · V.-A. Hoang
Department of Oriental Medicinal Materials and Processing, College of Life Science, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Republic of Korea



Cupriavidus yeoncheonense sp. nov., isolated from soil of ginseng

Priyanka Singh · Yeon-Ju Kim · Ngoc-Lan Nguyen · Van-An Hoang · Johan Sukewendathi · Mohamed El-Agamy Farh · Deok-Chun Yang

Received: 30 September 2014 / Accepted: 23 December 2014 / Published online: 19 February 2015
© Springer International Publishing Switzerland 2015

Abstract A novel bacterial strain, DCY86^T (=KCTC 42053^T = JCM 19890^T) was isolated from soil of a ginseng field in Yeoncheon province (38°04′00″N 126°57′00″E), Republic of Korea using a serial dilution method. Strain DCY86^T was observed to be Gram-stain negative, strictly aerobic, to grow optimally at 25–30 °C, at pH 7–7.5 and on tryptic soy agar medium. The cells were found to be sensitive to ceftazidime and tetracycline. Based on 16S rRNA gene sequence comparisons, strain DCY86^T was found to be most closely related to *Cupriavidus basilensis* LMG 18990^T (98.48 %), *Cupriavidus mucronensis* LMG 28411^T (98.34 %), *Cupriavidus pinastromis* KCTC 22125^T

(98.34 %) and *Cupriavidus lularis* KCTC 22126^T (98.00 %). The G+C content was determined to be 64.23 mol %. The only isoprenoid quinone detected in strain DCY86^T was ubiquinone Q-8. The major polar lipids were identified as diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, unidentified aminophospholipids and unidentified phospholipids. The major fatty acids were identified as C_{16:0} summed feature 3 (C_{16:1} ω7/c6c and/or iso-C_{15:0} 2-OH) and summed feature 8 (C_{18:1} ω7c and/or C_{18:1} ω6c). These data support the affiliation of strain DCY86^T to the genus *Cupriavidus*. Strain DCY86^T was also found to be able to solubilize phosphate and produce siderophores. The results of physiological and biochemical tests enabled strain DCY86^T to be differentiated genotypically and phenotypically from the recognized species of the genus *Cupriavidus*. Therefore, the novel isolate can be considered to represent a novel species, for which the name *Cupriavidus yeoncheonense* sp. nov. is proposed here. The type strain is DCY86^T (=KCTC 42053^T = JCM 19890^T).

Keywords *Cupriavidus yeoncheonense* · Proteobacteria · Ginseng · Polyphasic taxonomy

Introduction

The genus *Ralstonia* was proposed in 1995 to accommodate the misplaced species *Burkholderia piskoti*.



Arthrobacter ginsengisoli sp. nov., isolated from soil of a ginseng field

Muhammad Zubair Siddiqi · Yeon-Ju Kim · Van-An Hoang · Muhammad Hamid Siddiqi · Md. Amdadul Haq · Deok-Chun Yang

Received: 29 January 2014 / Revised: 4 August 2014 / Accepted: 5 August 2014 / Published online: 24 August 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract A Gram-staining-positive, catalase-positive, oxidase-negative, non-motile, non-flagellate and rod-shaped bacterium, was designated as DCY81^T, and isolated from soil of a ginseng field in Pocheon province, Republic of Korea. The 16S rRNA gene sequence analysis revealed that strain DCY81^T belonged to the genus *Arthrobacter*. Major fatty acid was anteiso-C_{15:0}, while major polar lipids were diphosphatidylglycerol, plaidylglycerol, phosphatidylinositol, monogalactosylidylglycerol (GL1), and dimannosylidylglycerol (GL2). The dominant quinone was MK-9(H). The peptidoglycan type was A3c with an L-Lys-4-Ala-1-Thr-4-Ala interpeptide bridge. The DNA–DNA hybridization relatedness between strain DCY81^T and *Arthrobacter siccitolerans* LMG 27359^T (98.2 %), *Arthrobacter sulfonivorans* JCM 13520^T (97.81 %), *Arthrobacter*

actinensis DSM 17756^T (97.59 %), *Arthrobacter oxydans* KCTC 3338^T (97.3 %), was 39.1 ± 0.2, 62.2 ± 1.6, 36.8 ± 1.1 and 48.3 ± 1.6 %, respectively which show that the genotypic separation of strain DCY81^T from the closest reference strain of the genus *Arthrobacter*. The DNA G+C content was 65.2 mol%. The genotypic analysis, physiological, and chemotaxonomic results indicate that strain DCY81^T represents a novel species of the genus *Arthrobacter*. Therefore, *Arthrobacter ginsengisoli* sp. nov. is proposed as the type strain (=KCTC 29225^T = JCM 19357^T).

Keywords Actinobacteria · *Arthrobacter ginsengisoli* · Taxonomy · Ginseng soil

Introduction

During the course of investigating bacterial diversity in the ginseng soil by culture-dependent methods, a large number of bacteria were isolated. At least 30 bacterial genera were found such as *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Epilithonimonas*, *Erwinia*, *Ewingella*, *Flavobacterium*, *Flexibacter*, *Klebsiella*, *Labrys*, *Microbacterium*, *Methylobacterium*, *Mucilaginibacter*, *Pedobacter*, *Planomonas*, *Pseudomonas*, *Paullimonas*, *Raoultella*, *Rhodococcus*, *Serratia*, *Solimonas*, *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Sphingopyxis*, *Stenotrophomonas* and *Weissella*. In this study, we attempted to describe strain DCY81^T, a novel strain of *Arthrobacter* genus.

The ginseng soil with pH 5.6 was collected from a 6-year-old ginseng field in Republic of Korea. The soil was thoroughly suspended with sterilized water, following serial dilution, was then spread onto a modified R2A medium (one-fifth R2A). The plates were incubated at

Communicated by Erko Stackebrandt.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain DCY81^T is KP212463.

Muhammad Zubair Siddiqi and Yeon-Ju Kim have contributed equally to this manuscript.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00203-014-1025-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Z. Siddiqi · Y.-J. Kim · V.-A. Hoang · M. H. Siddiqi · M. A. Haq · D.-C. Yang (✉)
Graduate School of Biotechnology, Ginseng Genetic Resource Bank, College of Life Science, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Republic of Korea
e-mail: deokchunyang@yaboo.co.kr

Y.-J. Kim
e-mail: yeonjukim@khu.ac.kr



Microbacterium panaciterrae sp. nov., isolated from the rhizosphere of ginseng

Ngoc-Lan Nguyen¹, Yeon-Ju Kim¹, Van-An Hoang¹, Jin-Woo Min¹, Kyu-Hyon Hwang² and Deok-Chun Yang^{1,2}

Correspondence

Deok-Chun Yang
deokchunyang@yaboo.co.kr
Yeon-Ju Kim
yeonjukim@khu.ac.kr

¹Korean Ginseng Center and Ginseng Genetic Resource Bank, Kyung Hee University, 1 Socheon-dong, Gihung-gu Yongin-si, Gyeonggi-do 449-701, Republic of Korea
²Graduate School of Biotechnology and Ginseng Bank, College of Life Science, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Republic of Korea
³GyeongDo Agricultural Research & Extension Services, Yeoncheon-gun, Gyeonggi-do 486-833, Republic of Korea

Strain DCY56^T was isolated from a soil sample taken from a ginseng field. The strain was Gram-reaction positive, catalase-positive, oxidase-negative, aerobic and non-motile. Phylogenetic analysis, based on 16S rRNA gene sequence analysis, indicated that strain DCY56^T belonged to the genus *Microbacterium*. The closest relatives were *Microbacterium azadiractae* AB-5282^T, *Microbacterium aerolum* V-73^T and *Microbacterium phytophagum* DSM 13468^T (98.0 %, 98.0 % and 97.6 % gene sequence similarity, respectively). The G+C content of the genomic DNA of strain DCY56^T was 88.5 mol%. The DNA–DNA relatedness values between strain DCY56^T and the most closely related type strains were lower than 36 %. The major polar lipids were phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol and an unidentified glycolipid. The predominant fatty acids contained iso-C_{16:0}, anteiso-C_{15:0}, and anteiso-C_{17:0}. The menaquinones were MK-12 and MK-13. The diagnostic diamino acid of strain DCY56^T was ornithine. The dominant whole-cell sugars were glucose, rhamnose and ribose. The results of the genotypic analysis, in combination with chemotaxonomic and physiological data, demonstrate that strain DCY56^T represents a novel species within the genus *Microbacterium*, for which the name *Microbacterium panaciterrae* sp. nov. is proposed. The type strain is DCY56^T (=KCTC 19884^T =JCM 17899^T).

The genus *Microbacterium* was proposed by Orla-Jensen (1919) and emended by Collins et al. (1983) and by Takachi & Hatanaka (1996). At the time of writing, the genus *Microbacterium* consists of 84 species (<http://www.bacterio.net/microbacterium.html>) with validly published names, with *Microbacterium lazarum* as the type species (Orla-Jensen, 1919). Members of the genus *Microbacterium* are short-rods, which are generally aerobic and catalase-positive. Major chemotaxonomic features of the genus *Microbacterium* are the presence of L-homoserine and D-ornithine, and glucose and rhamnose in the cell-wall peptidoglycan and sugars, respectively. The major polar lipids are diphosphatidylglycerol (DPG), phosphatidylglycerol (PG)

and glycolipids (GL). In this study, we describe a novel strain belonging to the genus *Microbacterium*, designated DCY56^T. Strain DCY56^T has been classified and characterized according to the Minimal Standards provided by Schumann et al. (2009).

A soil sample on the surface of ginseng roots cultivated in Changnam province, Republic of Korea, was collected and suspended in sterile water, followed by serial dilutions in 0.85 % (w/v) NaCl and spreading onto one-fifth-strength R2A medium (1/5 R2A). After culture at 30 °C for 7 days, single colonies were chosen for purification and sent for 16S rRNA sequencing. Strain DCY56^T was found to form white, smooth and circular colonies. Strain DCY56^T was routinely cultured on R2A agar at 30 °C and maintained in suspensions of R2A broth containing 25 % (v/v) glycerol at –70 °C.

Cell morphology was observed with a Nikon light microscope (100× magnification) and transmission electron microscopy (Carl Zeiss, LEO1012AB) at 100 kV under standard operating conditions. The Gram type of the cell

Abbreviations: DPG, diphosphatidylglycerol; GL, glycolipid; PG, phosphatidylglycerol; MALD-TOF/MS, matrix assisted desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain DCY56^T is KJ248473.

Three supplementary figures and two supplementary tables are available with the online Supplementary Material.

00041 © 2015 IUMS. Printed in Great Britain

927

Sphingomonas panacis sp. nov., isolated from rhizosphere of rusty ginseng

Priyanka Singh · Yeon-Ju Kim · Van-An Hoang · Mohamed El-Agamy Farh · Deok-Chun Yang

Received: 23 June 2015 / Accepted: 2 July 2015
© Springer International Publishing Switzerland 2015

Abstract The type strain DCY99^T was isolated from soil collected from a ginseng field in Hwacheon, Republic of Korea. Strain DCY99^T is Gram-negative, non-spore forming, motile, rod-shaped, and strictly aerobic. The bacteria grow optimally at 25–30 °C and pH 6.0–6.5. Phylogenetically, strain DCY99^T is most closely related to *Sphingomonas oligophenolica* JCM 12082^T, followed by *Sphingomonas asaccharolytica* KCTC 2825^T, *Sphingomonas mali* KCTC 2826^T, *Sphingomonas cynarae* JCM17498^T, *Sphingomonas pruni* KCTC 2824^T, and *Sphingomonas glacialis* DSM 22294^T. The DNA–DNA relatedness between strain DCY99^T and *S. oligophenolica* JCM 12082^T was 15.6 ± 0.4 %, and the DNA G+C content of strain DCY99^T was 64.4 mol%. An isopenoid quinone was

detected and identified as ubiquinone Q-10, and sym-homoserimidine was identified as the major polyamine of DCY99^T. The major polar lipids were identified as sphingoglycolipid, diphosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycerol, and phosphatidylcholine. C_{14:0}2OH, C_{16:0}, and summed feature 8 (C_{18:1} ω7c/C_{18:1} ω6c) were identified as the major fatty acids present in DCY99^T. The results of physiological and biochemical tests allowed strain DCY99^T to be differentiated phenotypically from other recognized species belonging to the genus *Sphingomonas*. Therefore, it is suggested that the newly isolated organism represents a novel species, for which the name *Sphingomonas panacis* sp. nov. is proposed with the type strain designated as DCY99^T (=JCM 30806^T =KCTC 42347^T).

Keywords *Sphingomonas panacis* · Ginseng · Polyphasic taxonomy

Introduction

The genus *Sphingomonas* was first proposed by Yabuuchi et al. (1990), and belongs to the family *Sphingomonadaceae*, the order *Sphingomonadales*, and the s-4 group of the class *Alphaproteobacteria* (Tala et al. 2013). In 2001, the genus *Sphingomonas* was split into four taxa based on phylogenetic, chemotaxonomic and phenotypic data, namely, *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera,

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10482-015-0527-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. Singh · Y.-J. Kim (✉) · V.-A. Hoang · D.-C. Yang (✉)
Department of Oriental Medicine Biotechnology, Ginseng Bank, College of Life Science, Kyung Hee University, Seocheon-dong, Giheung-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-701, Republic of Korea
e-mail: yeonjukim@khu.ac.kr
D.-C. Yang
e-mail: dcyang@khu.ac.kr

M. E.-A. Farh · D.-C. Yang
Graduate School of Biotechnology, College of Life Science, Kyung Hee University, Yongin-si, Gyeonggi-do 446-701, Republic of Korea

Published online: 09 July 2015



Lactobacillus vespulae sp. nov., isolated from gut of a queen wasp (*Vespula vulgaris*)

Van-An Hoang,^{1†} Yeon-Ju Kim,^{1†} Ngoc-Lan Nguyen,¹ Si Kwan Kim² and Deok-Chun Yang¹

Correspondence
Deok-Chun Yang
dcyang@khu.ac.kr
Si Kwan Kim
skkim@khu.ac.kr

¹Korean Ginseng Center and Ginseng Genetic Resource Bank, Kyung Hee University Giheung-gu Yongin-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

²Department of Life Science, Institute of Biomedical & Health Science, College of Biomedical & Health Science, Konkuk University, Chungju-si 380-701, Republic of Korea

A Gram-stain-positive, oxidase- and catalase-negative, rod-shaped, facultatively anaerobic bacterial strain, DCY75^T, was isolated from a queen wasp (*Vespula vulgaris*). Growth occurred at 4–37 °C (optimum, 30 °C), at pH 3.5–8.0 (optimum, pH 5.0–6.0) and with ≤7.0 % (w/v) NaCl. Strain DCY75^T produced gas during growth on glucose. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences indicated that strain DCY75^T belonged to the genus *Lactobacillus* and was closely related to *Lactobacillus sanfranciscensis* ATCC 27601^T and *Lactobacillus lindneri* DSM 20690^T at sequence similarities of 96.7 and 96.4 %, respectively. A comparison of two housekeeping genes, *phoC* and *spoA*, revealed that strain DCY75^T was well separated from other species of the genus *Lactobacillus*. Strain DCY75^T produced D- and L-lactic acid isomers in a ratio of 22.5 : 77.5 (w/w). The major fatty acids were summed feature 8 (comprising C_{14:1} ω7c and/or C_{14:1} ω6c), C_{16:1}, C_{18:1} ω7c and C_{18:1} ω6c. The peptidoglycan structure was of the A₄ (L-Lys-D-Asp) type. Cell-wall sugars were glucose, galactose and ribose. The DNA G+C content was 35.5 ± 1.3 mol%. Based on phenotypic and genotypic properties, strain DCY75^T represents a novel species of the genus *Lactobacillus*, for which the name *Lactobacillus vespulae* sp. nov. is proposed. The type strain is DCY75^T (=KCTC 21023^T =JCM 18742^T).

Species of the genus *Lactobacillus* have been isolated from a wide range of hosts and environmental materials (London, 1976; Claesson et al., 2008). The lactic acid bacteria (LAB) comprise a heterogeneous group that converts lactose and other simple sugars to lactic acid. LAB inhabit the intestinal tracts of humans and other mammalian and vertebrate species, and may provide benefits to their natural hosts (Patterson & Burkholder, 2003; Ohashi & Ushida, 2009) through their role in maintaining intestinal ecosystems (Sandine, 1979). For this reason the LAB are prepared and consumed as ‘probiotic’ supplements (Ouvchard et al., 2002).

In eukaryotes, symbiotic associations present stimuli for adaptation and genetic divergence. Arthropods serve very

well as model systems for study of such associations, especially since Paul Buchner’s (1965) seminal work demonstrating the diversity of micro-organisms associated with insects. Communities of symbiotic and transient micro-organisms in digestive tracts of insects support studies of microbial diversity and of metabolic activities that may lead to discovery of new bioactive products (Brennak, 2004; Evans & Armstrong, 2006). Advances in sequencing methods have enabled the extension of these investigations to a wide range of insects (Broderick et al., 2004; Moran et al., 2012). *Vagococcus entomophilus* was isolated from the digestive tract of a wasp (*Vespula vulgaris*) (Killer et al., 2014b). The honey bee presents an interesting model for such studies because gut micro-organisms facilitate digestion, nutrition and immune defences in their host (Engel et al., 2012; Killer et al., 2014a).

This study was conducted to explore the intestinal microflora of the wasp. We isolated, cultivated and preserved a novel *Lactobacillus*-like strain, and here characterize it using a polyphasic approach. Samples were collected from an apiary in the Republic of Korea. A wasp (*Vespula vulgaris* queen) was sterilized externally with 70 % alcohol and dissected under sterile conditions. Whole intestinal

[†]These authors contributed equally to this manuscript.

Abbreviation: LAB, lactic acid bacteria.

The GenBank/EMBL/DBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain DCY75^T is JX863367.

Five supplementary figures are available with the online Supplementary Material.

000420 © 2015 IJMS Printed in Great Britain

1

<그림> 분류학적 신종 등록을 위한 논문 게재

2절. 한국형 유용미생물을 이용한 minor 사포닌의 생성 원천기술 확립

[개요]

- 분리 균주 중 사포닌 전환활성이 높은 산업적 활용 균주 선발
- 한국형 분리 균주인 *L. rossiase* DC05, *P. ginsengiterrae* DCY89
L. panaxibrevis DCY65, *M. esteraromaticum* GS514, *W. hellenica* DC06 의
인삼 사포닌 최적 전환 활성 조건을 탐색

(1) Crude enzyme 추출

선발된 균주를 MRS 배지를 사용하여 30°C, 190rpm에서 현탁 배양하였다. 세포 내외 효소를 얻고자, 균배양액은 4°C에서 15,000×g로 10분 원심 분리하였다.

(2) 세포 내 외 효소활성 확인

원심분리 한 균주의 세포를 1M Sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 녹여서 5분간 sonication을 한 후 원심 분리하여 세포 내 효소를 분리하였다. 상층액은 4배의 냉각 EtOH을 첨가하여 충분히 혼합시킨 후 0°C에서 40분 방치하여 단백질을 침전시켰다. 위 용액은 4°C에서 10,000×g로 40분 원심분리 후 상등액은 버리고 침전물은 sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 용해시켜 조 효소액으로 사용하였다.

(3) 진세노사이드와 반응

효소 액을 조제한 후, 1 mM ginsenoside와 1:1 (v/v)의 비율로 혼합하고 30°C, 190rpm에서 72시간 반응시켰다. 반응과정 중 24시간 간격으로 반응 혼합물을 1.5 ml 씩 취하여 동량의 수포화부탄올로 추출하고 TLC plate에 점적하여 전환여부를 확인하였다. 점적한 TLC plate를 CHCl₃/MeOH/H₂O(65:35:10, v/v/v, 하층) 혼합용매로 5.5 cm 전개한 후 10% H₂SO₄를 분무하여 가열을 통해 발색시켰다.

(4) Ginsenoside 분석

TLC (Thin Layer Chromatography)

부탄올 추출액을 Silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate(Merck, Germany)에 점적한 후 chloroform/methanol/water (65:35:10 v/v/v, lower phase)의 혼합 용매를 사용하여 전개하였다. 전개한 TLC plate는 10% 황산을 분사시킨 후 열을 가해 발색시켜 사포닌 전환 양상을 확인하였다.

(5) HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

부탄올 추출액을 감압농축 한 후 Methanol (HPLC grade)에 용해 한 후 0.2 μm membrane filter에 여과하여 HPLC 분석용 시료로 이용하였다. HPLC 분석에는 C18column (3.0x50mmmm, ID 5μm)을 사용하여 UV 203 nm에서 검출 하였다. 이동상은 acetonitrile (solvent A)과 water (solvent B)를 이용하여 gradient를 주었으며

1.6 ml/min 유속으로 분리하였으며, 이동상의 gradient 조건은 Table 와 같다.

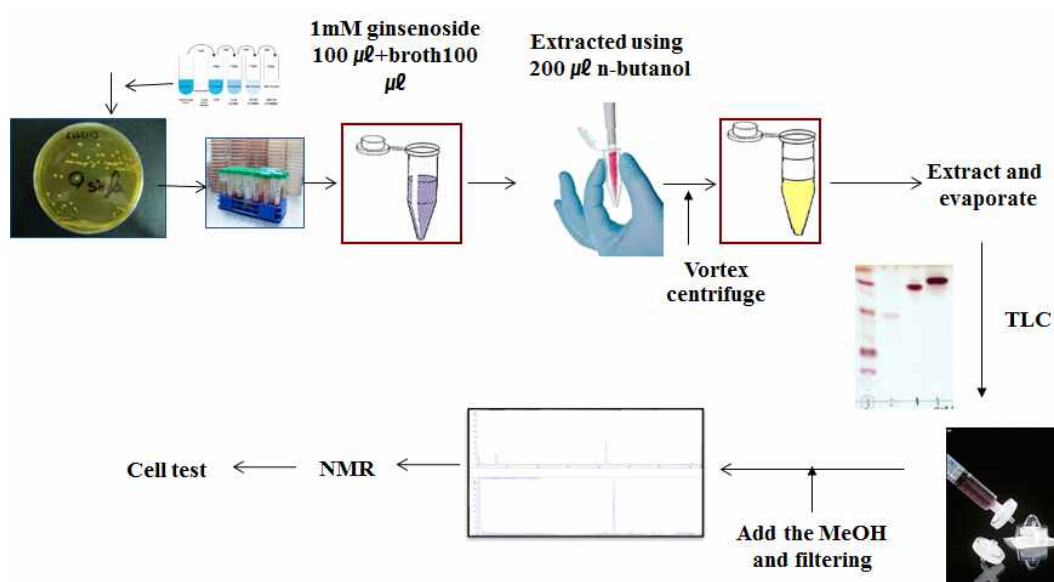


표. 변환 사포닌 분석을 위한 HPLC 분석 조건

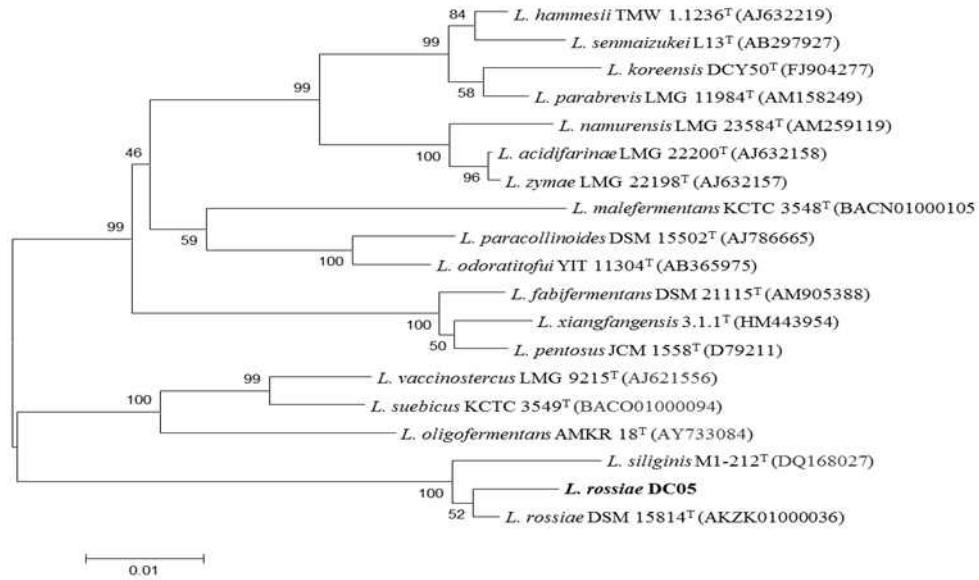
Time (min)	Mobile phase*		
	Solvent A	Solvent B	
0.00	17	83	*Sol
6.00	17	83	ven
9.00	23	77	t A:
16.5	23.5	76.5	100
19.00	31	69	%
29.00	45	55	acet
31.00	47	53	onit
33.00	90	10	rile,
34.00	90	10	Elu
35.00	17	83	ent
37.00	17	83	

B: 100% water.

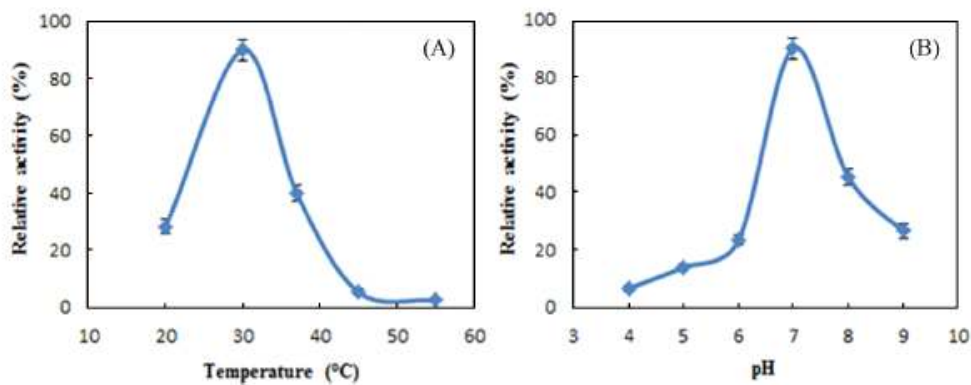
가. 분리 균주 *L. rossiae* DC05를 이용한 인삼 minor 사포닌의 생성

<그림> 분리 균주 *L. rossiae* DC05의 유연관계 분석

분리 균주는 *L. rossiae*와 99.1% 상동성을 지닌 균주로 확인되었으며, 본 연구팀에서는 strain DC05로 명명하여 기존의 균주와의 분류학적 특성 비교 검정을 통한 균주의 신종으로서 가능성 여부를 검증하고 있다. 본 균주는 뛰어난 β -glucosidase 활성 및 사

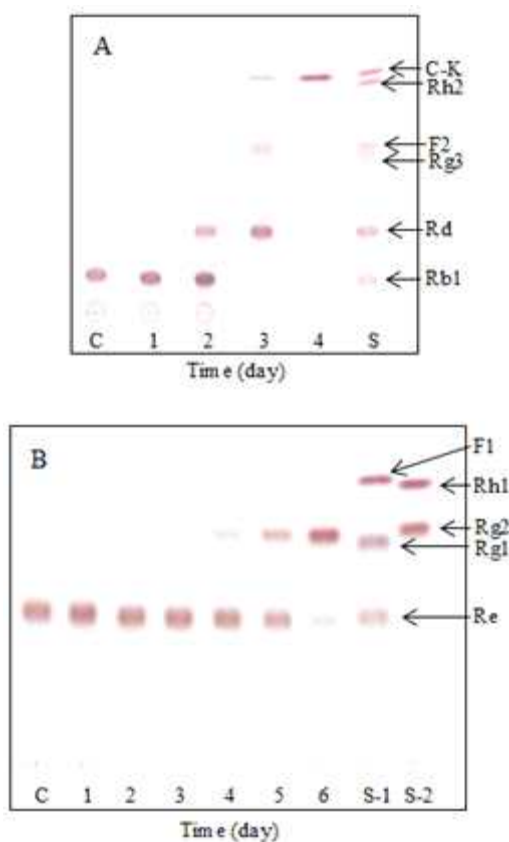


포닌 전환 활성을 가진 것이 확인 된 바 산업화 적용을 위한 최적화 연구를 수행 하였다. 본 균주의 배양에 따른 β -glucosidase 활성의 최적 조건을 확립하기 위하여 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (*p*-NPG)를 assay를 실시하였으며, 균주의 효소를 함유한 20 mM sodium phosphate (pH 7.0)에 *p*-NPG를 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 1 M sodium carbonate 를 첨가하여 반응을 중지시켜 유리되는 *p*-nitrophenol (*p*-NP)의 양을 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1단위 (unit)는 반응시간 분당 생성되는 *p*-nitrophenol 1umol을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.



<그림> *L. rossiae* DC05의 성장 조건별 β -glucosidase 활성 assay

그 결과, 위와 같이 최적 효소 활성 조건을 확립 하였으며, 본 균주는 pH7.0, 온도 30℃에서 가장 뛰어난 enzyme 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 이의 조건을 활용하여 인삼 사포닌 Rb1, Re과의 반응을 수행하였으며 그 결과를 TLC를 통하여 확인하였다.

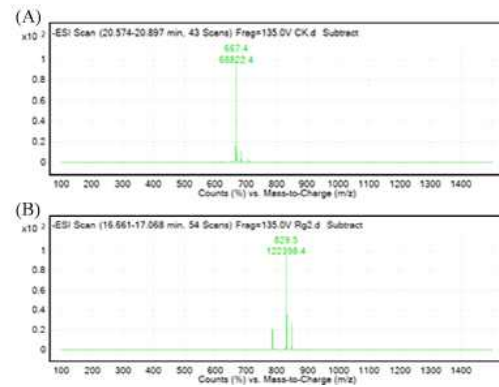
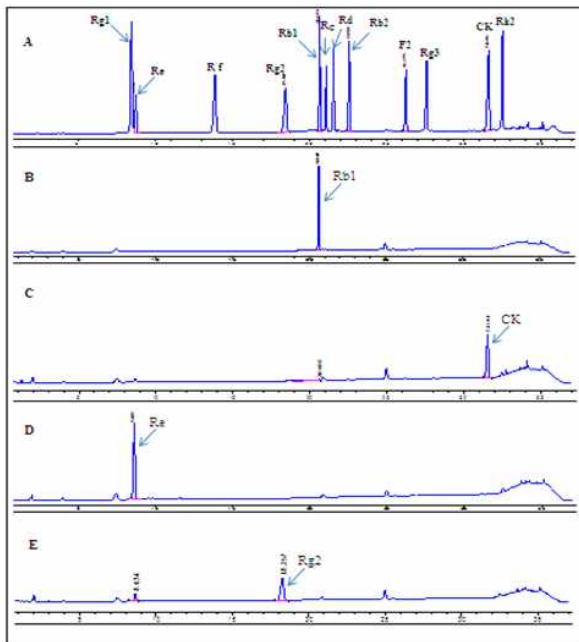
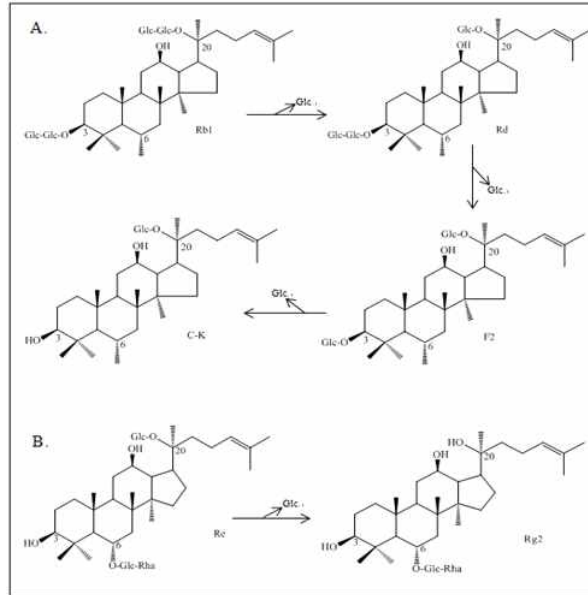


<그림> *L. rossiae* DC05의 기질별 반응 TLC 결과

Ginsenoside Rb1의 경우 Rd, F2를 거쳐 C-K를 생성하는 것을 확인 할 수 있었으며, Re의 경우 최종적으로 Rg2로 전환되는 것이 확인되었다.

<그림> 분리 균주 *L. rossiae* DC05 사포닌 전환 대사 경로

HPLC와 LC/MS를 이용하여 각각의 최종 대사 물질인 C-K와 Rg2 생성되었음을 재확인 하였으며, 전환 수율을 계산하여 본 결과 C-K 72.88%, Rg2 53.94% 전환을 보여 매우 뛰어난 전환 수율을 확인 할 수 있었다.

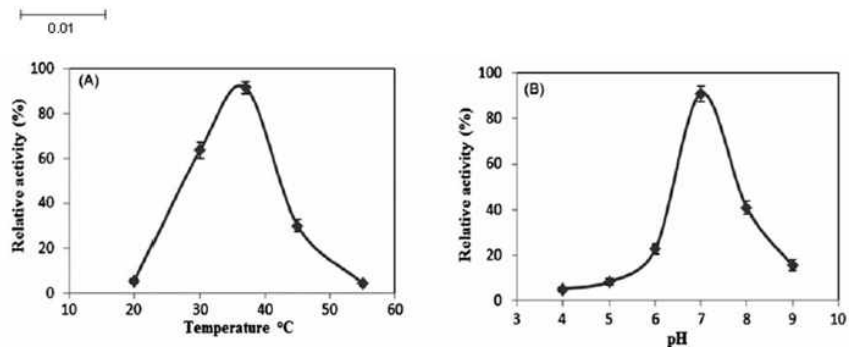
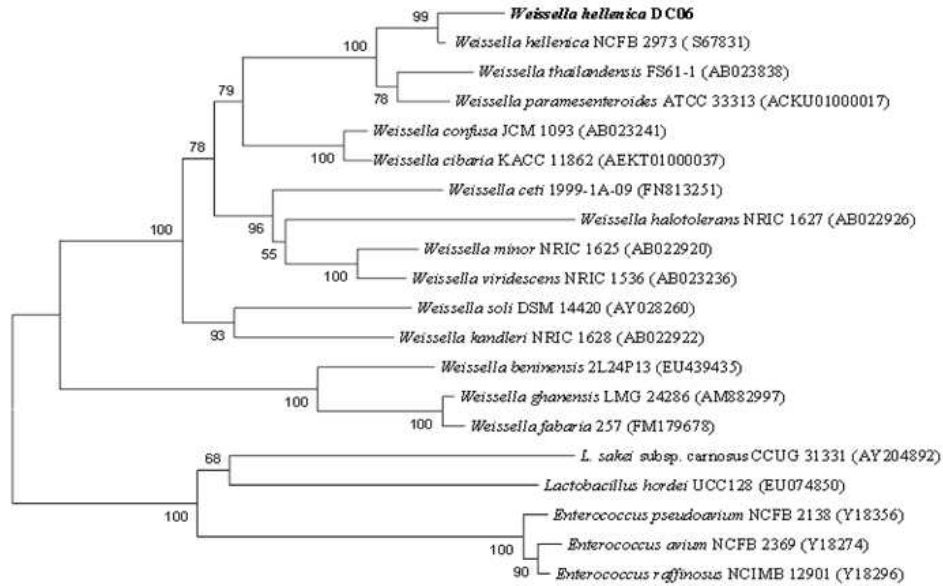


<그림> HPLC 및 LC/MS를 통한 사포닌 결과 확인

나. 분리 균주 *Weissella. hellenica* DC06를 이용한 인삼 minor 사포닌의 생성

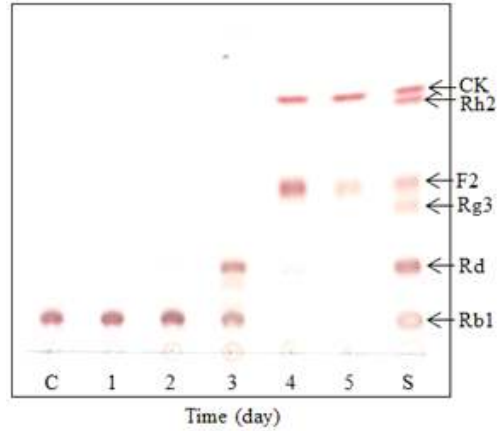
분리 균주는 16S rRNA gene sequencing를 통하여 계통분류학적 위치를 결정하였으며, 그 방법은 위의 방법과 같다. 분리 균주는 *W. hellenica*와 99.3% 상동성을 지닌 균주로 확인되었으며, 본 연구팀에서는 strain DC06로 명명하여 기존의 균주와의 분류학적 특성 비교 검정을 통한 균주의 신종으로서 가능성 여부를 검증하고 있다.

<그림> 분리 균주 *W. hellenica* DC06의 유연관계 분석



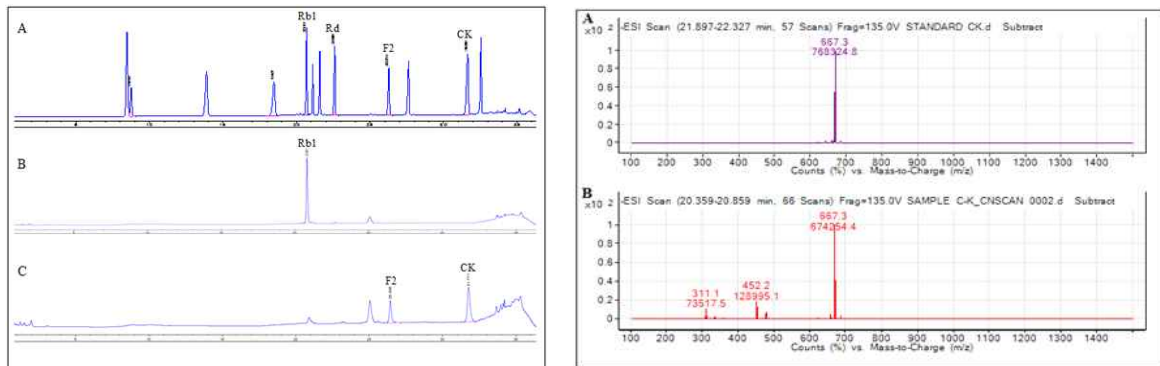
<그림> *W. hellenica* DC06의 성장 조건별 최적 β -glucosidase 활성 탐색

최적 효소 활성 조건을 확립을 통하여, 본 균주는 pH7.0, 온도 37°C에서 가장 뛰어난 enzyme 활성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 이의 조건을 활용하여 인삼 사포닌 Rb1, Re과의 반응을 수행하였으며 그 결과를 TLC를 통하여 확인하였다.



<그림> *W. hellenica* DC06의 기질별 반응 TLC 결과

반응 결과 Re의 경우 특이적 반응을 나타내지 않았으며, PPD type인 ginsenoside Rb1의 경우 Rd와 F2를 거쳐 C-K 생성되는 것이 확인되는 바, 앞서 분리 하여 확인하였던, *L. rossiae* DC05 균주와 유사한 활성을 가지는 것이 확인 되었다.

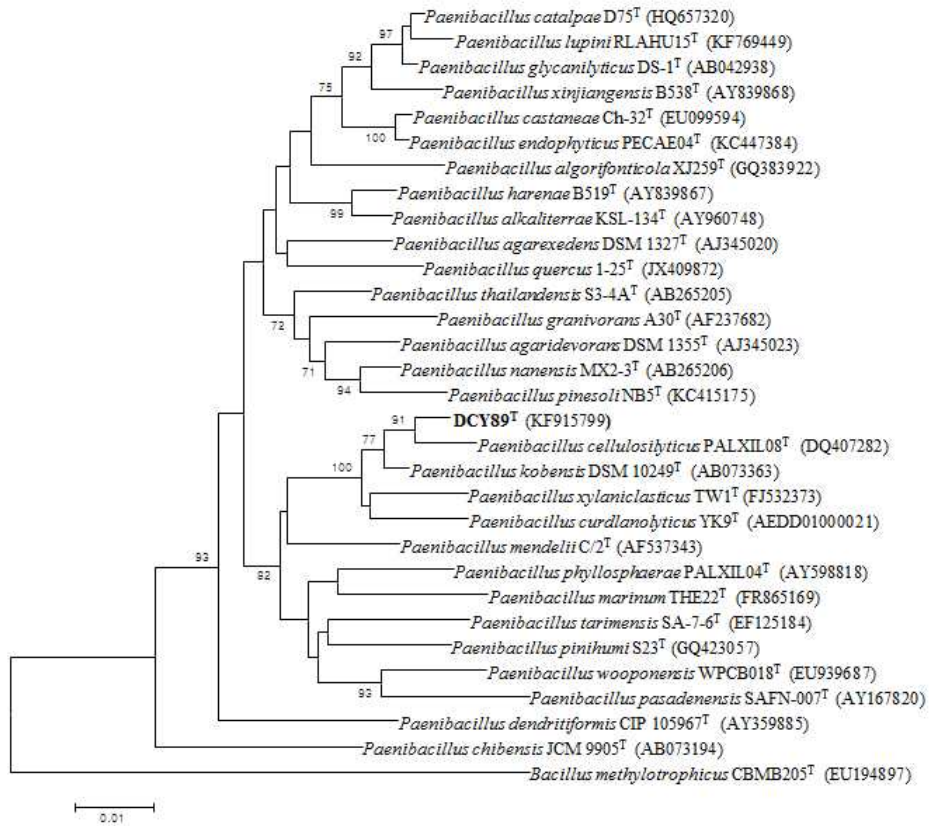


<그림> HPLC 및 LC/MS를 통한 사포닌 결과 확인

HPLC와 LC/MS를 이용하여 *W. hellenica* DC06을 이용하여 전환된 최종 대사 물질이 C-K임을 재확인 하였으며, 전환 수율을 계산하여 본 결과 **C-K 61.73%로 전환 됨을 확인 할 수 있었다.**

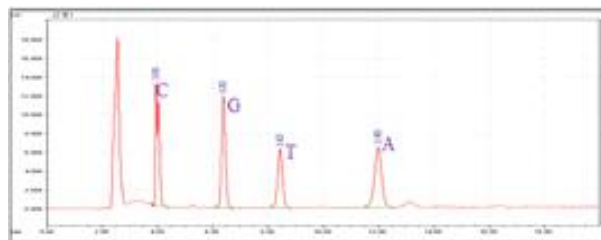
다. 분리 균주 *Paenibacillus ginsengiterrae* DCY89를 이용한 인삼 minor 사포닌의 생성

분리 균주는 16S rRNA gene sequencing를 통하여 계통분류학적 위치를 결정하였으며, 그 방법은 위의 방법과 같다. 분리 균주는 *Paenibacillus cellulosilyticus* 와 98.2% 상동성을 지닌 균주로 확인되었으며, 본 연구팀에서는 strain DCY89로 명명하여 기존의 균주와의 분류학적 특성 비교 검정을 연구를 통해 균주의 신종으로 등록 하고자 하였다.



<그림> 분리 균주 *Paenibacillus ginsengiterrae* DCY89의 유연관계 분석

분리된 strain DCY89T의 DNA G+C content는 52.5 mol %로 확인 되었으며, 이는 기존의 보고된 균들과 유사한 범위에 속하는 것으로 동속의 균주임을 재확인 할 수 있었다.



<그림> 분리 균주 *Paenibacillus ginsengiterrae* DCY89의 GC contents 분석

strain DCY89T과 가까운 유연관계에 있는 균주들의 DNA-DNA relatedness 결과 *P. cellulosityticus* KACC 14175T; *P. kobensis* KACC 15273T; *P. xyliniclasticus* KCTC 13719T; and *P. curdlanolyticus*, KCTC 3759T 가 각각 22.7 ± 3.4 , 17.8 ± 1.2 , 31.3 ± 3.2 , and 37.4 ± 1.0 값을 나타낸 것을 확인 할 수 있었다. 유전학적 분류 계통에 따라 70% 미만의 상동성의 경우 다른 종을 나타내어 본 분리 된 균주가 새로운 종임을 확인 할 수 있었다.

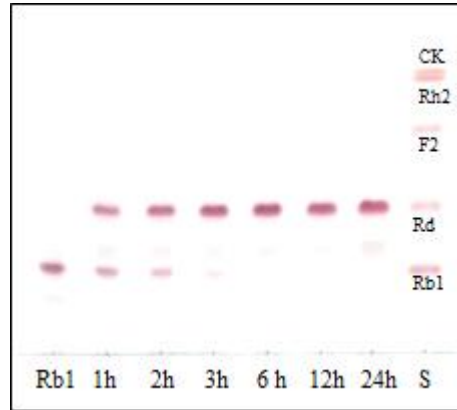
<표> 분리 균주 *Paenibacillus ginsengiterrae* DCY89의 특성 검정

Characteristics	1	2	3	4	5
<i>Hydrolysis of:</i>					
Arginine	-	+	+	+	+
Urea	-	+	-	+	+
Gelatin	+	-	+	-	+
<i>Enzyme activity:</i>					
α -Glucosidase	-	w	-	-	+
β -Glucosidase	+	+	-	+	-
β -Galactosidase	+	+	-	+	+
<i>Assimilation of:</i>					
L-Rhamnose	+	-	+	-	-
N-Acetyl-glucose	+	-	+	-	+
D-Ribose	+	-	+	-	w
Inositol	+	-	+	-	+
D-Saccharose	+	+	+	-	+
Itaconic acid	w	w	w	-	-
Suberic acid	w	w	-	-	-
Sodium malonate	-	-	w	-	w
Sodium acetate	w	-	w	-	w
Lactic acid	w	-	w	-	-
L-Alanine	w	-	w	-	w
Potassium 5-ketogluconate	w	w	w	-	w
L-Serine	w	-	w	-	-
D-Mannitol	+	-	+	-	-
L-Fucose	w	w	w	-	w
D-Sorbitol	-	-	w	w	w
Valeric acid	-	-	w	-	w
Trisodium citrate	w	-	+	-	w
L-Histidine	+	-	+	-	+
Potassium 2-ketogluconate	-	-	+	-	-
3-Hydroxybutyric acid	-	-	w	w	-
4-Hydroxybenzoic acid	+	w	w	-	-
L-Proline	-	-	w	-	w

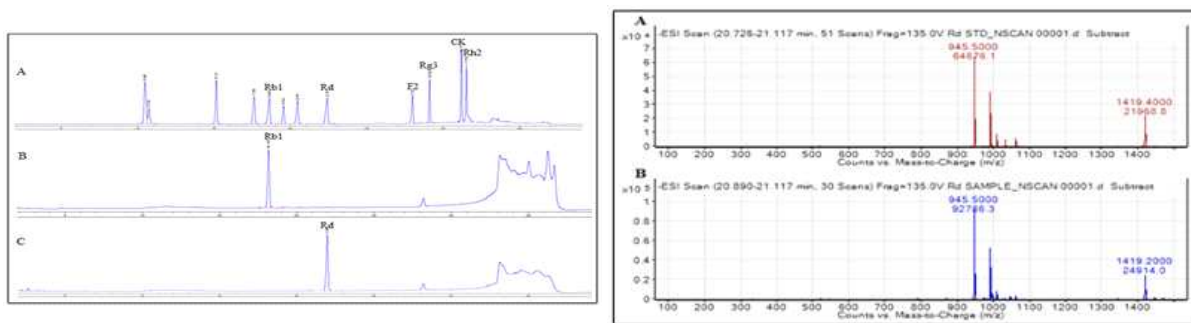
Fatty acid	1	2	3	4	5
<i>Saturated fatty acid</i>					
C _{12:0}	1.31	0.71	ND	ND	0.66
C _{14:0}	1.52	1.01	0.66	0.63	1.07
C _{16:0}	7.95	8.88	1.47	11.09	8.38
C _{17:0}	ND	0.38	ND	1.48	0.24
C _{18:0}	ND	0.37	4.21	1.46	0.45
C _{20:0}	ND	ND	2.71	ND	0.14
<i>Branched-chain fatty acid (iso)</i>					
iso-C _{13:0}	ND	ND	0.7	ND	0.13
iso-C _{14:0}	2.89	2.71	1.25	0.72	3.6
iso-C _{15:0}	9.41	6.21	14.01	1.53	7.24
iso-C _{16:0}	16.41	25.37	0.48	23.64	17.44
iso-C _{17:0}	3.43	4.81	5.36	1.67	3.95
iso-C _{18:0}	ND	0.28	ND	0.37	0.15
iso-C _{19:0}	ND	ND	3.29	ND	ND
<i>Branched-chain fatty acid (anteiso)</i>					
anteiso-C _{11:0}	ND	ND	ND	1.36	ND
anteiso-C _{13:0}	ND	1.13	ND	ND	0.16
anteiso-C _{15:0}	45.68	37.65	51.46	35.76	49.17
anteiso-C _{17:0}	7.09	9.79	9.12	19.51	5.02
anteiso-C _{19:0}	ND	ND	2.53	ND	ND
Summed feature 4 ^a	1.4	ND	ND	ND	0.19
Summed feature 5 ^b	0.66	ND	ND	ND	0.52

더불어 기존 분리 보고된 type strain 균주와의 생화학적 특성 검정을 통해 기존 균주와의 차별성을 검증하였고, 이를 바탕으로하여 본 균주가 기존에 보고되지 않은 새로운 균주임을 최초로 보고하였다.

본 실험 군주의 사포닌 전환 활성을 확인해 보기 위하여 major ginsenoside를 기질로 하여 반응 시험을 진행하였고, 그 결과 Re의 경우 특이적 반응을 나타내지 않았으며, PPD type인 ginsenoside Rb1의 경우 Rd를 생성되는 것이 확인되었다.



<그림> *Paenibacillus ginsengiterrae* DCY89의 생물전환 반응 TLC 결과

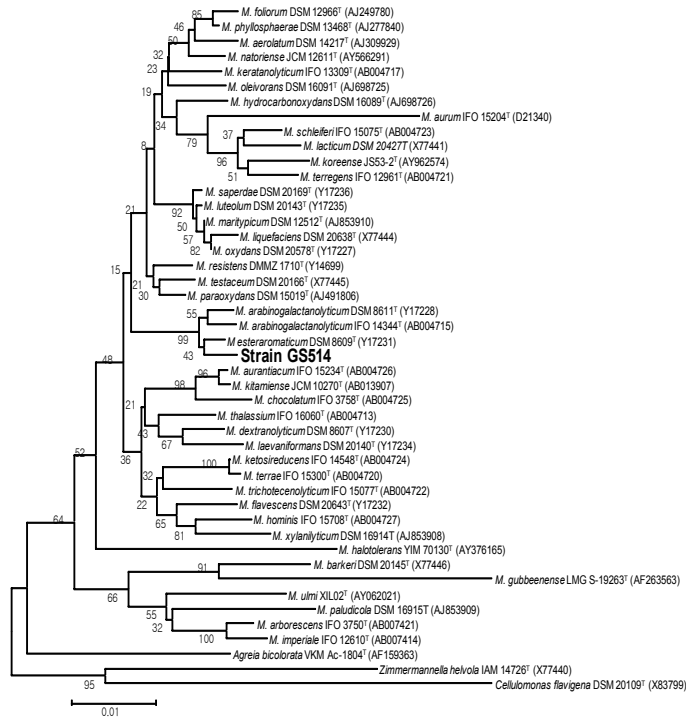


<그림> HPLC 및 LC/MS를 통한 사포닌 결과 확인

HPLC와 LC/MS를 이용하여 *Paenibacillus ginsengiterrae* DCY89을 이용하여 전환된 최종 대사 물질이 Rd임을 재확인 하였으며, 전환 수율을 계산하여 본 결과 **C-K 82.11%로 전환 됨을 확인 할 수 있었다.**

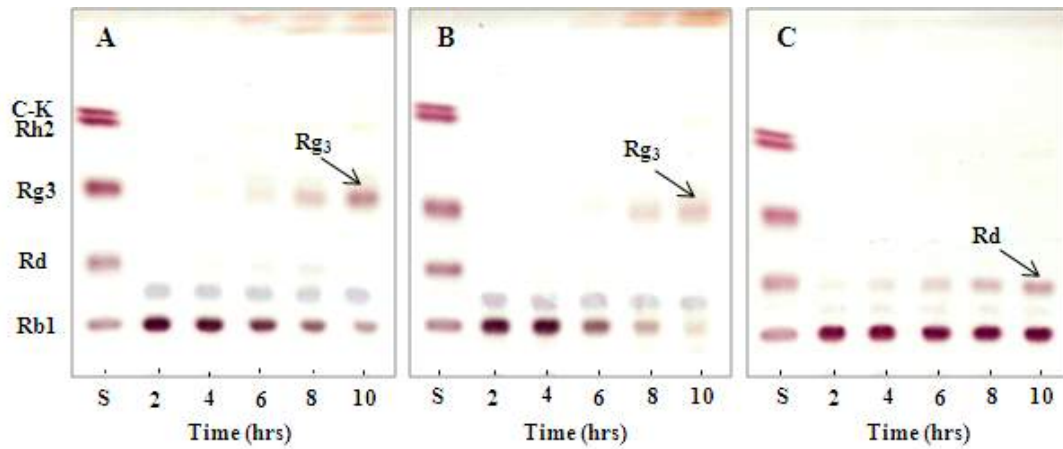
라. 분리 균주 *M. esteraromaticum* GS514를 이용한 인삼 minor 사포닌의 생성

strain GS514는 본 연구팀의 선행연구를 통하여 사포닌 전환 활성이 뛰어난 것을 확인한 바 있다. 본 균주는 *Microbacterium* genus에 속하는 관련 균주들과의 유연관계를 비교한 결과 *M. esteraromaticum* DSM 8609^T(Y17231)와 99.1% 일치하여 가장 높은 상동성을 갖는 것으로 확인되었으며, 이에 *M. esteraromaticum* GS514로 명명하였다.



<그림> *M. esteraromaticum* GS514의 유연관계 분석

M. esteraromaticum GS514 균주는 Major ginsenoside인 Rb1을 가수 분해 시켜 Rg3로 생성시키는 효소를 분비하는 것으로 확인 되었다.

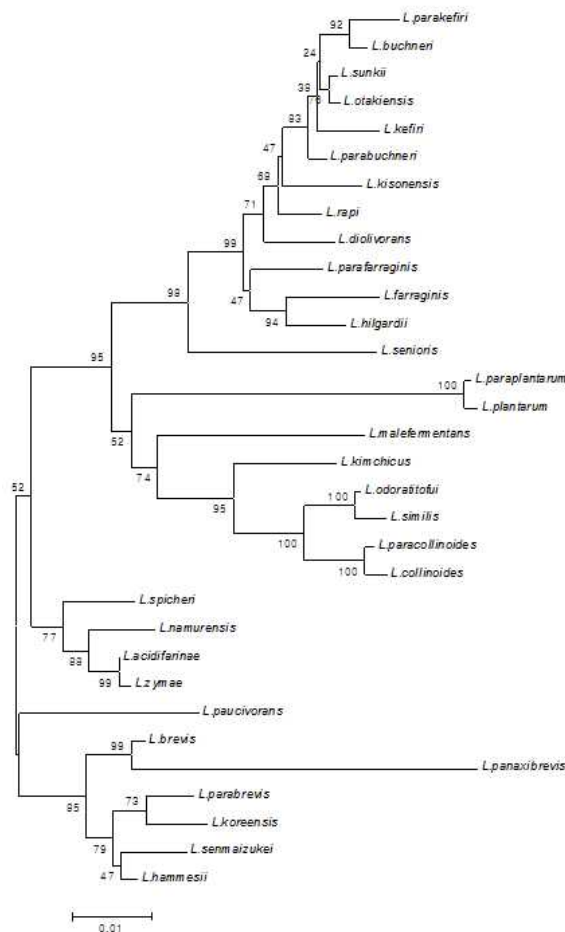


따라서, *M. esteraromaticum* GS514 균주의 β -glucosidase 활성도 및 ginsenoside Rb₁으로부터 ginsenoside Rg₃로의 전환 능력을 이용하여 minor 사포닌을 대량으로 생성할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

마. 분리 균주 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65를 이용한 인삼 minor 사포닌의 생성

(1) *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65를 이용한 인삼 minor 사포닌의 생성

16S rRNA sequence를 NCBI에서 BLAST를 이용하여 등록된 균주들과의 상동성을 비교한 결과 *Lactobacillus brevis* 과 가장 높은 상동성을 나타내었다. *Lactobacillus* genus 내에 속해 있는 모든 species들의 type strain 의 16S rRNA gene 염기서열을 조사하여 Bioedit program과 Clustal X program을 이용하여 alignment 하고 MEGA3 program으로 phylogenetic tree를 그려 본 후, 이들 중 strain DCY65 균주와 가까운 유연관계를 갖고 있는 species들을 선별하여 다시 phylogenetic tree를 작성하였다. strain DCY65 균주는 *Lactobacillus brevis*균주와 97% 상동성을 나타내어 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65으로 동정하였다.



<그림> 분리 균주 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65의 유연관계 분석

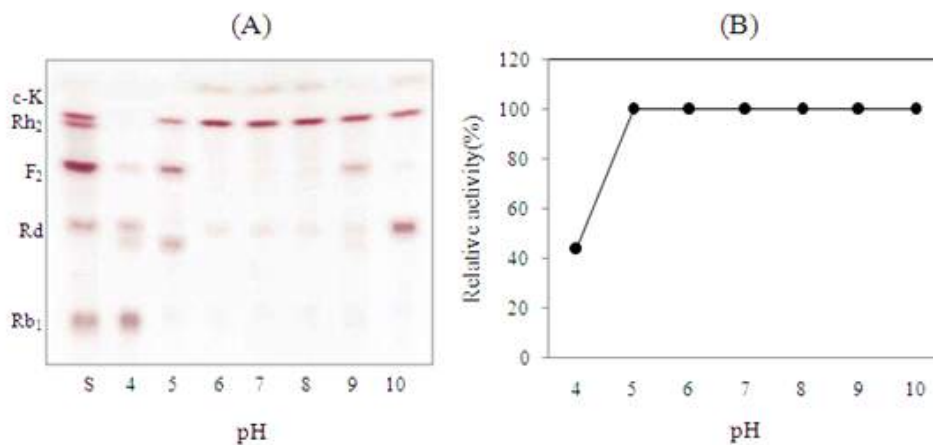
분리된 strain DCY65T의 DNA G+C content는 46.5 mol %로 확인 되었으며, 이는 기존의 보고된 균들과 유사한 범위에 속하는 것으로 동속의 균주임을 재확인 할 수 있었다.

strain DCY89T과 가까운 유연관계에 있는 균주들의 DNA-DNA relatedness 결과 *L. brevis* 14687T; *L. parabrevis* AM158249T; *L. koreensis* EJ904277T; and *L. senmaizukei* AB297927T; *L. hammesii* AJ632219T 가 각각 26.1 ± 2.4 , 28.8 ± 2.1 , 30.9 ± 6.1 , 27.6 ± 4.3 and 21.3 ± 3.3 값을 나타낸 것을 확인 할 수 있었다. 유전학적 분류 계통에 따라 70% 미만의 상동성의 경우 다른 종을 나타내어 본 분리 된 균주가 새로운 종임을 확인 할 수 있었다.



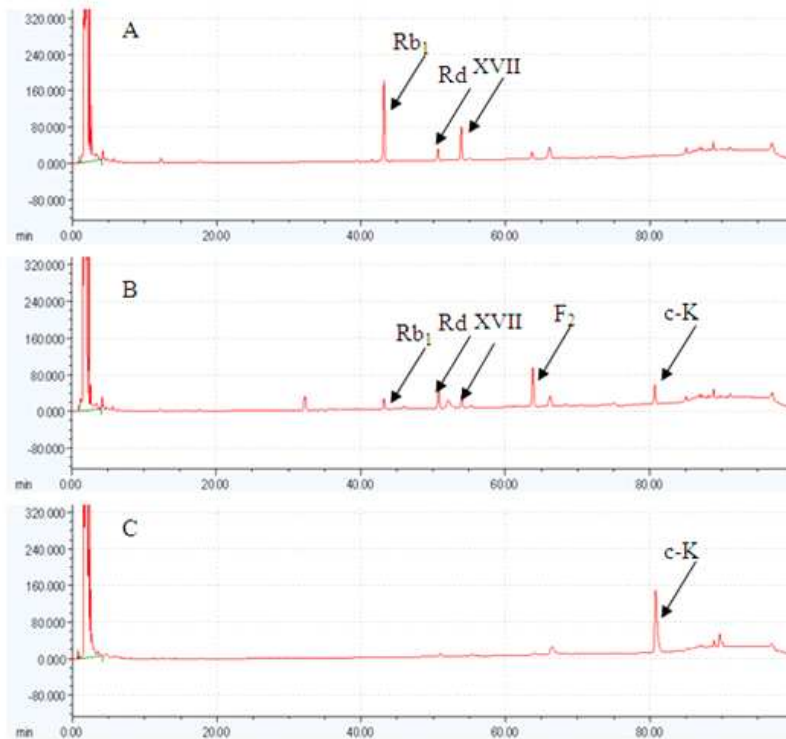
Fatty acid	1	2	3	4	5	6
Saturated						
C _{14:0}	1.6	1.5	tr	1.9	1.2	1.2
C _{16:0}	14.4	13.4	6.1	10.8	4.7	5.3
Unsaturated						
C _{15:1 ω6c}	tr	tr	tr	1.5	3.0	2.8
C _{16:1 ω5c}	2.1	1.5	tr	1.0	tr	tr
C _{17:1 ω6c}	tr	tr	tr	tr	1.4	1.2
C _{17:1 ω8c}	tr	tr	tr	tr	1.2	tr
Branched						
iso-C _{15:0}	24.1	23.6	31.2	25.7	24.7	31.4
iso-C _{15:0} 3-OH	5.1	4.8	8.9	5.4	8.3	7.3
iso-C _{15:1} G	2.2	1.7	1.2	2.7	5.2	3.5
anteiso-C _{15:0}	3.0	2.6	1.5	1.7	1.5	1.6
iso-C _{16:0}	tr	tr	1.2	tr	tr	tr
iso-C _{16:0} 3-OH	tr	tr	tr	tr	1.0	tr
iso-C _{17:0}	tr	tr	1.5	tr	tr	tr
iso-C _{17:0} 3-OH	5.2	5.5	10.3	4.3	8.2	6.2
iso-C _{17:1 ω9c}	2.0	2.6	6.5	2.0	tr	2.3
Hydroxy						
C _{15:0} 3-OH	-	-	-	1.18	1.7	1.3
C _{16:0} 3-OH	5.4	5.4	2.6	6.9	5.7	3.8
Summed feature 3*	19.9	22.7	12.1	22.9	14.6	14.0

<표> 분리 균주 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65의 특성 검정



<그림> *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65 의 생물전환 반응 TLC 결과

본 실험 군주의 사포닌 전환 활성을 확인해 보기 위하여 major ginsenoside를 기질로 하여 반응 시험을 진행하였고, 그 결과 Re의 경우 특이적 반응을 나타내지 않았으며, PPD type인 ginsenoside Rb1의 경우 gypenoside XVII를 거쳐 ginsenoside F2를 주로 생성하며 C-K로의 생성은 유도 하는 것이 확인되었다. HPLC를 이용하여 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65을 이용하여 전환된 최종 대사 물질이 C-K임을 재확인 하였으며, 전환 수율을 계산하여 본 결과 C-K 82,10%로 전환 됨을 확인 할 수 있었다.

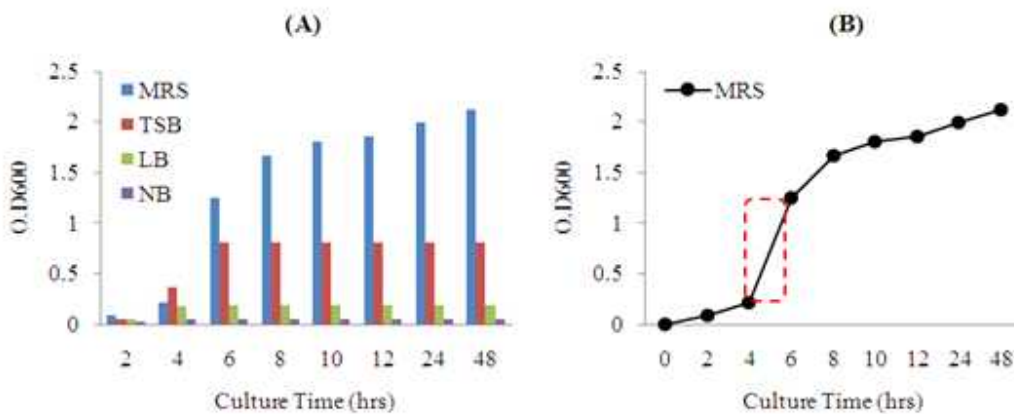


<그림> HPLC 및 LC/MS를 통한 사포닌 결과 확인

(2) *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65의 C-K 생산 최적 발효 조건 탐색

본 균주를 산업적으로 이용하기 위하여 균주의 최적 배양 조건 및 발효 조건을 확립하고자 하였다.

*Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65 균주를 colony를 취하여 MRS broth에서 24 시간 배양한 현탁액을 LB, NB, TSB, MRS에 1%(v/v) 씩 접종한 후 190 rpm, 37°C 조건에서 배양하여 일정한 시간간격으로 O.D600값을 측정하여 균주의 성장을 확인하였다



<그림> 배지별 균주 최적 성장 조건 확립

*Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65 균주의 성장속도는 MRS>TSB>LB>NB 순으로 나타났다. MRS broth와 TSB에서의 성장속도는 배양 4시간까지 유사하였지만 그 이후로 MRS broth에서의 성장속도가 가장 빠른 것을 확인할 수 있었다. MRS 배지에서의 성장 곡선을 그려 본 결과, *Lactobacillus panaxibrevi*s 균주는 4~6시간 사이에 성장 속도가 가장 빠르므로 이 균주의 대수기라는 것을 확인할 수 있었다.

① *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65 균주의 성장에 미치는 온도의 영향

*Lactobacillus panaxibrevi*s 균주는 MRS broth에 접종하여 배양온도를 각각 25°C, 30°C, 37°C, 45°C로 24 시간 배양하여 O.D₆₀₀값을 측정하였다. 그 결과 *Lactobacillus panaxibrevi*s 균주의 생장은 온도의 영향을 많이 받았다. *Lactobacillus panaxibrevi*s 균주는 37°C에서 가장 높은 성장속도를 보였고 30°C, 25°C순으로 성장속도가 느려지며 45°C에서 잘 자라지 않는 것을 확인할 수 있었다.

<표> 온도 조건에 따른 *Lactobacillus panaxibrevis*의 성장

Temperature (°C)	25	30	37	45
O.D ₆₀₀	1.579	1.616	1.713	0.195

② *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65 균주의 성장에 미치는 pH의 영향

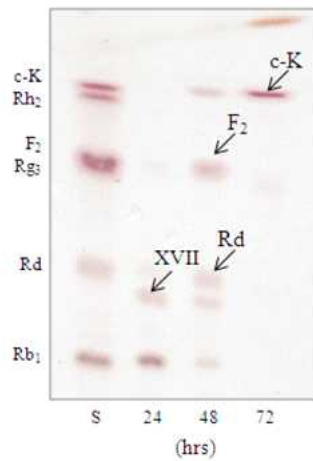
MRS broth를 HCl 과 NaOH를 이용하여 pH를 조절한 후 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65 균주를 24시간 배양하였다(Table 10). 균주는 pH5.0에서 잘 자라지 않았으며 pH6.5 ~ 8.0범위 내에는 큰 차이 없이 모두 잘 성장하는 것을 확인할수 있었다. MRS broth 자체의 pH가 6.7이기 때문에 아래의 실험에서 pH를 조절하지 않고 직접 균 배양에 사용하였다.

<표> pH 조건에 따른 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65의 성장

pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
O.D ₆₀₀	0.390	1.276	1.708	1.894	1.914	1.941	1.973

③ TLC 분석에 의한 ginsenoside pattern조사

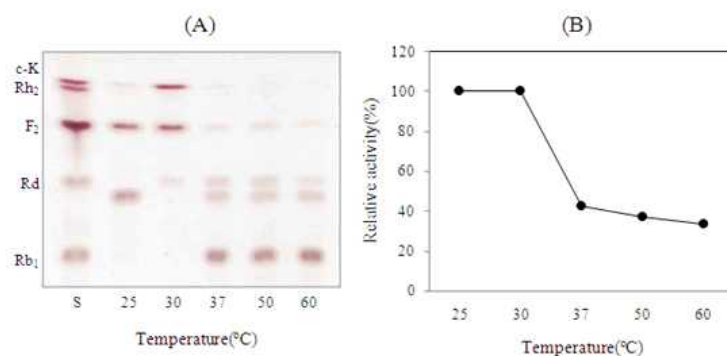
반응 시간에 따른 ginsenoside Rb₁의 전환을 그림에서 나타내었다. 반응 24시간부터 ginsenoside Rb₁은 gypenoside XVII로 전환되기 시작하였고 반응 48시간에는 gypenoside XVII, ginsenoside Rd, F₂로 전환되었으며 반응 72시간에는 ginsenoside Rb₁이 전부 분해되어 compound K 로 전환되는 것을 관찰할 수 있었다.



<그림> *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65에 의한 사포닌의 전환

④ 사포닌 전환 활성에 미치는 온도의 영향

ginsenoside Rb₁의 전환효소의 최적 반응 온도를 알기 위해 온도 별로 (25℃, 30℃, 37℃, 50℃, 60℃) 48 시간 반응시켜 그 결과를 확인하였다. *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65과 Rb₁의 반응은 그림에서 보다 싶이 온도의 영향을 크게 받았다. TLC분석에서 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65 균주의 사포닌 전환 활성은 30℃에서 가장 뛰어나며, 25℃와 37℃이상의 온도에서는 효소활성이 급격히 저하되는 것을 관찰 할 수 있었다.



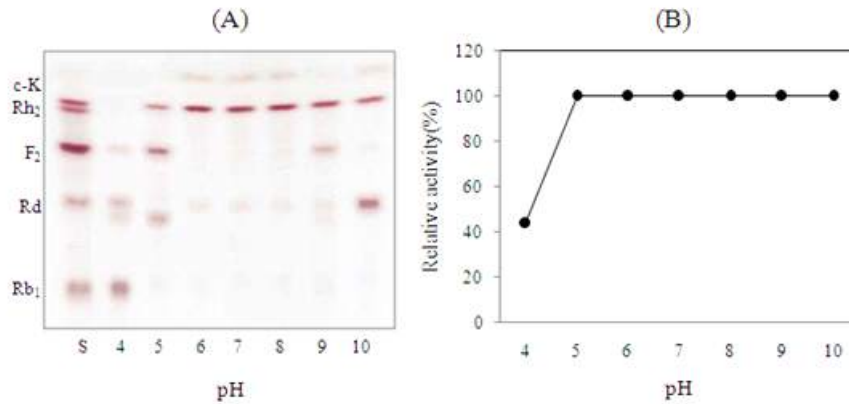
<그림> *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65의 사포닌 전환 활성에 미치는 온도의 영향

온도 별 반응산물을 HPLC를 통하여 정량분석을 수행한 결과 TLC분석과 유사한 경향을 나타내었다. 즉 효소의 활성은 30℃에서 가장 높은 활성을 보였고 25℃에서도 활성이 비교적 높지만 37℃이상의 온도에서는 효소활성이 급격히 저하되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이는 *Candida peltata* 유래의 β -glucosidase의 최적반응온도가 50℃ (Saha and Bothast, 1996), *Rhizopus japonicas* 유래의 β -glucosidase의 최적 온도는 45℃ (Kim *et al.*, 1989), *Paecilomyces thermophila*의 β -glucosidase의 최적 온도는 75℃ (Yang *et al.*, 2008) 등 기존의 보고들과 달리 좀 낮은 온도를 나타냈고 *Lactobacillus brevis* LH8 유래의 β -glucosidase의 최적 온도는 30℃라는 보고와 유사하였다.

⑤ 효소활성에 미치는 pH의 영향

Lactobacillus panaxibrevis DCY65 균주의 사포닌 전환 활성에 대한 pH의 영향을 조사한 결과 TLC상에서 pH5.0~10.0에서 높은 활성을 나타내었고 그 중 pH6.0~8.0이 가장 높은 ginsenoside Rb₁의 전환활성을 나타내었으며 pH4.0과 pH10.0에서는 효소활성이 급격히 저하된 것을 확인할 수 있었다. pH별 반응 산물을 HPLC로 정량분석한 결과 비슷한 경향이 나타났다.

<그림> *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65의 사포닌 전환 활성에 미치는 pH의 영향



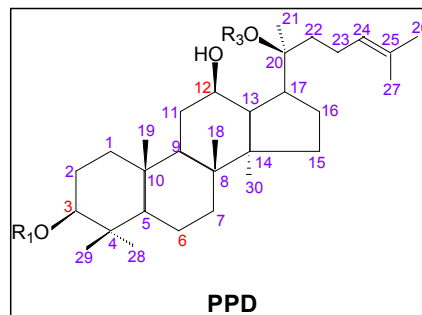
이것은 *Paecilomyces thermophila*의 β -glucosidase의 최적 pH는 6.2 (Yang *et al.*, 2008), *Rhizopus japonicus* 유래의 β -glucosidase의 최적 pH는 4.8~5.0 (Kim *et al.*, 1989), *Leuconostoc brevis* LH8 유래의 β -glucosidase의 최적 pH는 6.0~12.0 (Quan *et al.*, 2008), *Candida peltata* 유래의 β -glucosidase의 최적 pH는 5.0 (Saha and Bothast, 1996), 등 기존의 보고들과 유사하였다.

종합적으로 보았을 때, 본 연구 팀에서는 사포닌 전환 활성이 있는 균주로 분리된 균주 중 산업적으로 활용하기 위하여 가장 적합한 균주를 선별하기 위하여 각 균주를 비교하여 본 결과 식품으로 이용가치가 높은 유산균 중 *Lactobacillus brevis*와 유사 상동성을 지닌 신규 유산균인 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65 균주가 본 과제에서 목적으로 하는 C-K의 생성 전환율이 가장 높은 것으로 확인되어 활용가치가 있을 것으로 판단되었다. 더불어 stain GS514 균주의 경우 기존에 알려진 glucosidase의 enzyme pathway와 다른 패턴을 가짐을 확인하였고, 특이적으로 ginsenoside Rg3를 다량으로 생성할 수 있음이 확인된 바, 이를 이용하여 유용 사포닌을 대량으로 생성시켜 화장품 소재로서 활용하고자 하였다.

분리 균주 명	사포닌 전환	전환율	이용범위	비고
<i>L. rossiae</i> DC05	C-K 생성	72.88%		
	Rg2 생성	53.94%		
<i>W. hellenica</i> DC06	C-K 생성	62.73%		
<i>P. ginsengiterrae</i> DCY89	C-K 생성	77.11%		
<i>L. panaxibrevis</i> DCY65	C-K 생성	82.10%	식품, 화장품	신규사포닌 생성
<i>M. esteraromaticum</i> GS514	Rg3 생성	69.11%	화장품소재	

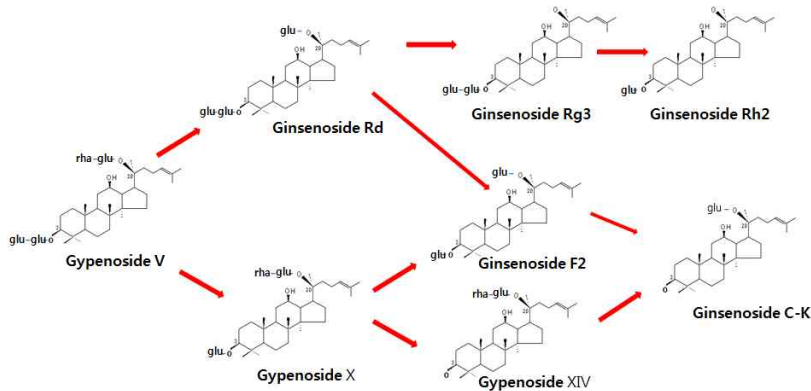
바. 돌외를 이용한 인삼 사포닌의 전환

돌외 (*Gynostemma pentaphyllum*)는 박과(Cucurbitaceae)에 속하는 다년생 덩굴성 초본류로서(Blumert and Liu, 1999), 예로부터 칠엽담(七葉膽)이라고 하여 주로 전초 또는 지상부위를 약용으로 이용해 왔다. 돌외에는 다량의 사포닌 성분이 함유되어 있으며 지상부로부터 사포닌을 분리하여 이를 gypenoside라고 명명 한 것을 계기로 지금까지 약 100여 종의 사포닌이 분리 된 것으로 보고되고 있다. 돌외에는 진정 효과를 가지고 있다고 알려진 protopanaxdiol계 사포닌(PPD)을 다량 함유하고 있으며 그 중 gypenoside V는 돌외의 대표적인 major 성분으로 알려져 있다.

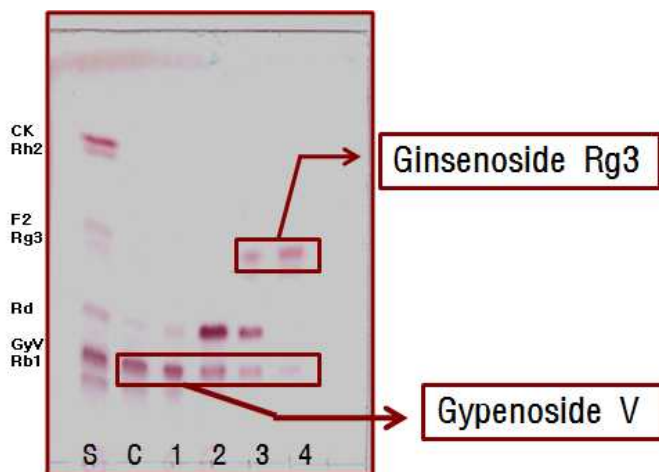


종류	R1	R2
ginsenoside Rb1	glu(2→1)glu	glu(6→1)glu
gypenoside V	glu(2→1)glu	glu(6→1)rha

돌외의 gypenoside V는 ginsenoside Rb1과 비교하였을 때 C-20에 결합 되어진 당의 한 종류가 gypenoside V이 glucose-rhamnose인 것에 반하여 ginsenoside Rb1의 경우 glucose-glucose 결합 구조를 가지고 있어 결합되어진 당의 한 부분만을 제외하면 동일 구조를 가지고 있는 것을 알 수 있다. 따라서 gypenoside V에서 rhamnose를 가수 분해 시킨다면 인삼의 ginsenoside Rd 및 다양한 인삼 사포닌으로의 변환이 가능하다.

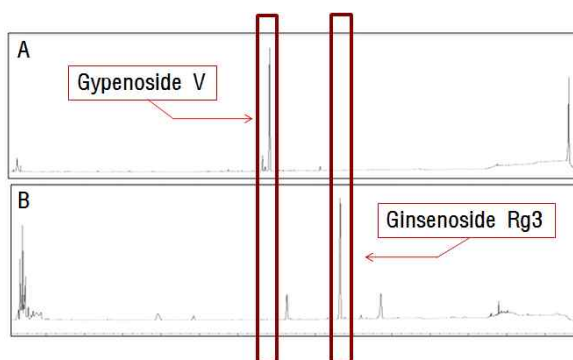


이에 본 연구에서는 돌외의 gypenoside V를 이용하여 인삼의 minor 사포닌으로 전환을 수행하고자 하며, 전환 효소는 본 연구팀에서 개발한 미생물 효소를 활용하고자 하였다.



<그림> 돌외의 gypenoside V의 ginsenoside Rg3로의 전환

본 연구에서 이용한 Gypenoside V의 전환 결과 ginsenoside Rg3가 생성됨을 확인 할 수 있었다.



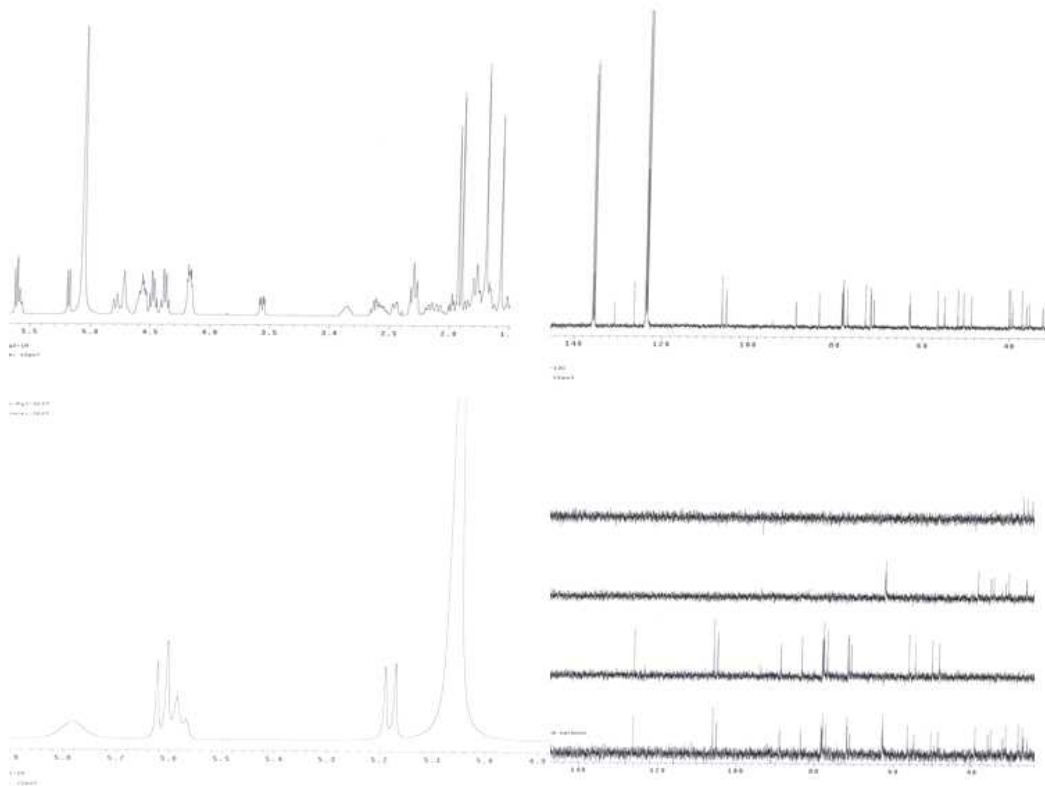
<그림> 돌외의 gypenoside V의 ginsenoside Rg3로의 전환

HPLC를 이용한 정량 분석을 통해 Gypenoside V가 ginsenoside Rd, ginsenoside Rg3으로 전환된 산물의 양을 확인 하였다. Strain GS514 균주로부터 유래된 효소는 gypenoside V 10mg을 최종적으로 ginsenoside Rd 0.8mg과 ginsenoside Rg3 4.9mg으로 변환 시킬 수 있었다. 본 연구는 인삼 사포닌과 구조적으로 유사한 물질이 생물전환을 통하여 인삼 사포닌화 될 수 있다는 것을 확인한 결과로 고부가가치의 인삼 사포닌을 보다 저비용으로 생산할 수 있다는 점에서 유용할 것으로 사료 되며, 산업적으로 응용할 경우 원가경쟁력을 갖춘 기능성 소재를 개발 할 수 있을 것으로 기대된다. 분리 한 물질을 NMR을 통하여 구조 동정 하였으며, 인삼외의 식물로부터 인삼 사포닌 Rg3가 생성되었음을 재 확인 하였다.

<표> ^{13}C -NMR spectrum of ginsenoside Rg3

C	20(R)-Rg3	20(S)-Rg3	Sample	C	20(R)-Rg3	20(S)-Rg3	Sample
1	39.2	39.2	39.3	22	43.3	36.0	36.0
2	26.7	26.8	26.9	23	22.7	23.1	23.2
3	89.0	89.0	89.0	24	126.1	126.4	126.3
4	39.8	39.8	39.8	25	130.8	130.8	130.7
5	56.4	56.5	56.5	26	25.9	25.9	25.9
6	18.5	18.5	18.6	27	17.7	17.1	17.2
7	35.2	35.3	35.3	28	28.2	28.2	27.2
8	40.0	40.1	40.1	29	16.6	16.7	16.8
9	50.4	50.5	50.5	30	17.4	17.8	17.8
10	37.0	37.0	37.0	3-O-inn er-Glc- 1	105.2	105.2	105.1
11	32.2	32.1	32.2	2	83.5	83.5	83.6
12	70.9	71.0	71.1	3	78.0	78.0	78.0
13	49.3	48.7	48.7	4	71.8	71.8	71.7
14	51.9	51.8	51.8	5	78.1	78.3	78.3
15	31.5	31.4	31.5	6	62.9	62.9	62.9
16	26.8	26.9	27.0	Outer- Glu-1	106.1	106.1	106.1
17	50.7	54.9	54.9	2	77.2	77.2	77.2
18	15.9	15.9	16.0	3	78.4	78.4	78.4
19	16.4	16.4	16.5	4	71.7	71.7	71.7
20	73.0	73.0	73.0	5	78.3	78.2	78.2
21	22.8	28.2	28.3	6	62.8	62.8	62.8

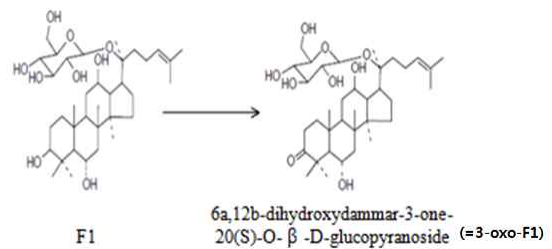
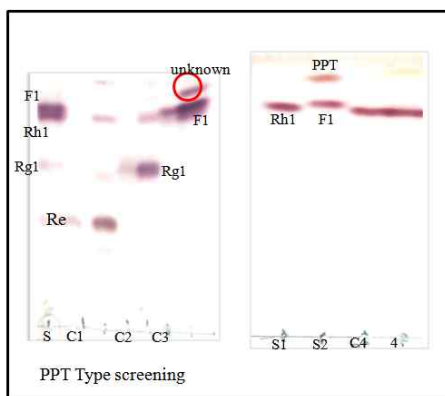
<그림> NMR을 이용한 gypenoside V의 ginsenoside Rg3 전환 산물의 구조 동정



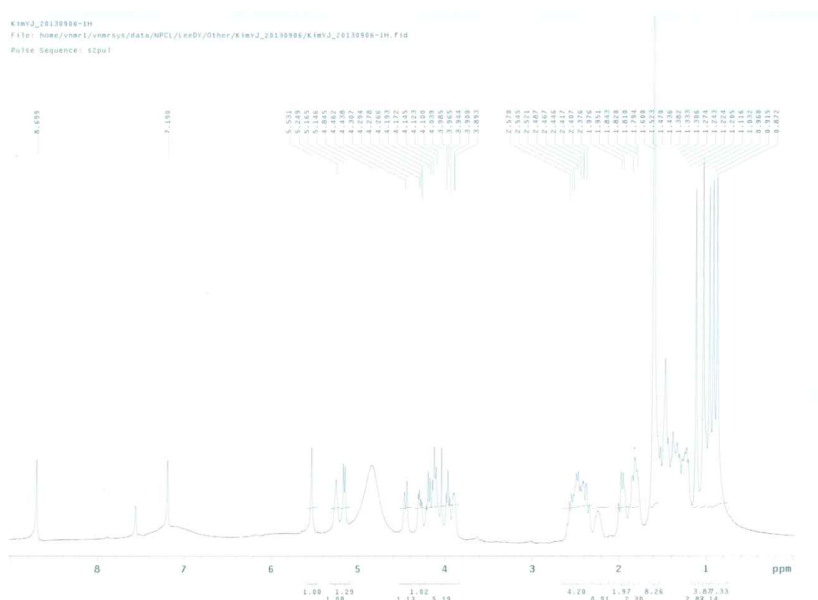
4절. 한국형 유산균을 활용한 신규 인삼 사포닌의 생성 및 대량화 공정 개발

가. *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65를 활용한 신규 사포닌의 생성

본 연구를 통하여 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65 균주가 발효 조건에 따라 기존에 알려지지 않은 새로운 사포닌 전환 대사체를 생성하는 것을 관찰되었으며, 이는 ginsenoside aglycone의 -OH기를 ketone화 시키는데서 기인한 것으로 확인되어 이들 물질을 산업적으로 이용한다면 기존의 물질과 차별화된 새로운 기능성물질을 발굴 할 수 있을 것으로 기대되었다.



<그림> *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65에 의한 신규 사포닌의 생성

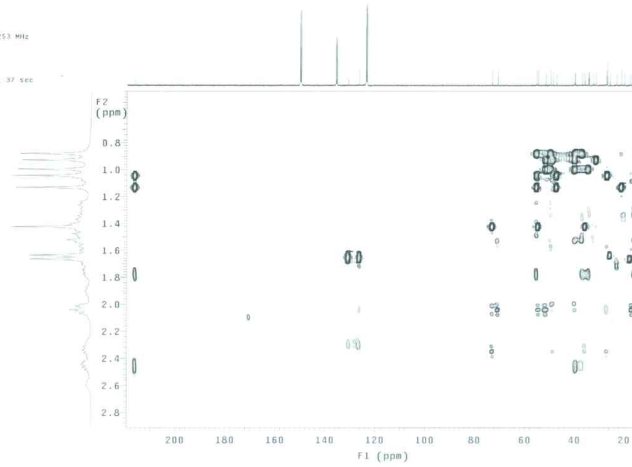


<그림> *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65에 의한 신규 사포닌 3-oxo-CK의 ¹H NMR spectrum

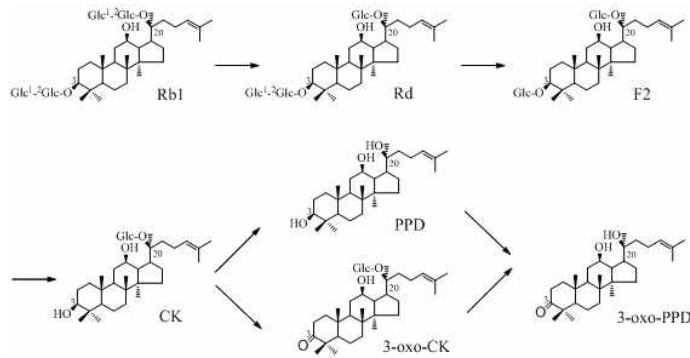

```

keto-ppd-hmbc
File: home/vmr1/vmrsys/Data/NPCL/LcdPr/ROA/keto-ppd/keto-ppd-hmbc.fid
Pulse Sequence: gHMBC
Solvent: pyridine
Temp: 30.0 C, 288.1 K
Observed: vnmr
F1: keto-ppd-hmbc
INSTRUM: spect
Relax: delay 1.500 sec
Mixing: 5.000 sec
Dec: time 0.100 sec
Width: 6402.6 Hz
2D Width: 10247.2 Hz
# F2: 16
# F1: 16
OBSRV: H1, 400.1532253 MHz
Date Acq: 2008.08.04
F1 DATA PROCESSING
Date Pr: 2008.08.04
PT Size: 1024 x 1024
Total Time: 1 hr, 9 min, 37 sec

```



<그림> *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65에 의한 신규 사포닌 3-oxo-PPD의 HMBC NMR spectrum

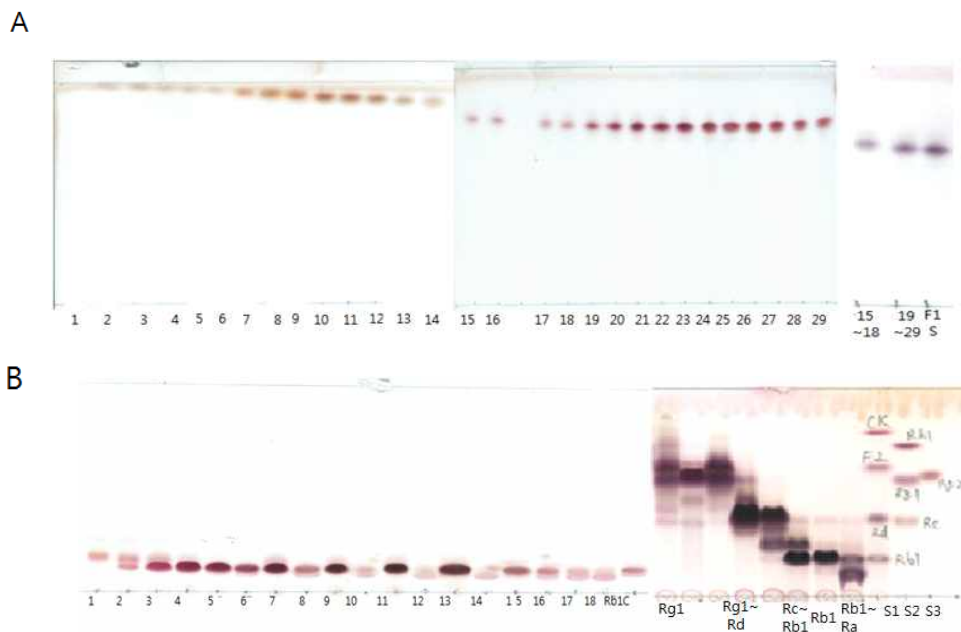


<그림> *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65에 의한 신규 사포닌의 생성

나. *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65 신규 사포닌의 소재화를 위한
대량화 공정 개발

(1) 기질물질용 진세노사이드 분리

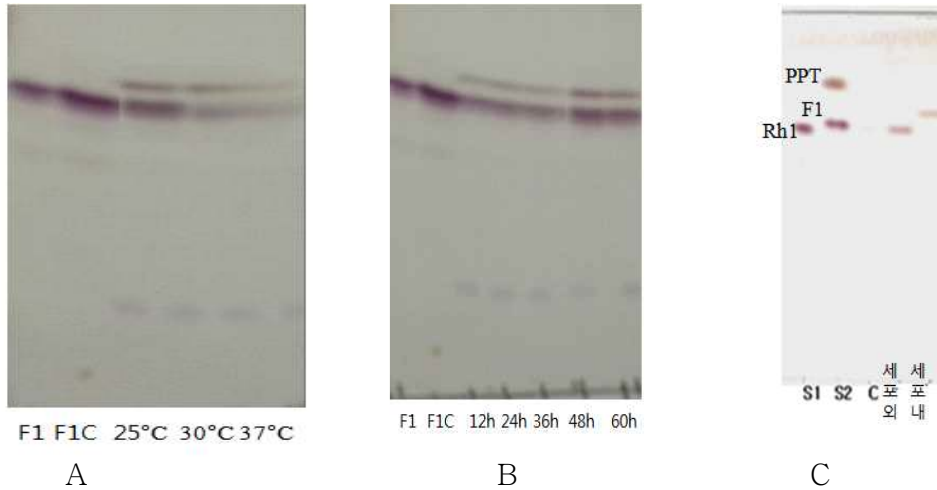
단일 진세노사이드 Rb1과 F1을 얻기 위해, 잎 사포닌과 농축액을 사용하였다. Crude Ginsenoside로부터 Silica gel column chromatography (CHCl₃/MeOH= 13:1~9:1 v/v)를 통해 정제 하였고, 분획별로 모아 TLC로 확인하였다(Fig. 6). F1을 분리하기 위해 분획들(Fraction No.A. 19~19)만 모아 감압 농축하였고, Rb1(B)또한 이와 같은 방법을 사용하여 얻을 수 있었다.



<그림> 기질물질으로 사용할 ginsenoside의 분리

(2) 진세노사이드 변환 : 변환 Enzyme의 최적 활성 공정 개발

각 균주를 고체배지에서 하루 동안 배양한 후, 멸균 증류수에 현탁하여 MRS broth에 1%씩 접종하고 24시간 동안 30°C shaking incubator에서 160 rpm의 속도로 배양 세포내외 효소를 각각 분리하여 진세노사이드와 반응하여, 활성을 확인한 결과 Fig.7.과 같이 세포내외효소의 활성이 높은 것을 확인할 수 있었습니다. 또한 세포내 효소의 시간, 온도 별 활성을 확인한 결과 25~30 °C 최적,48h에서 가장 최적활성 보였다.



<그림> TLC를 통한 ginsenoside F1의 변환확인

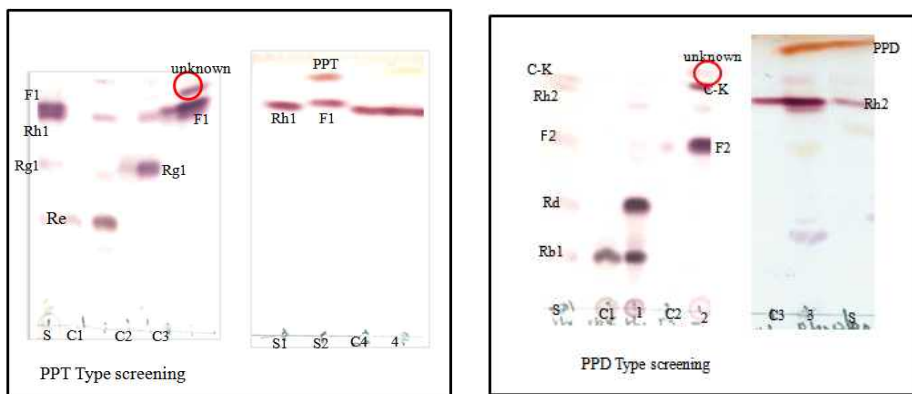
A: The optimum temperature (25°C, 30°C, 37°C)

B: The optimum time (12h, 24h, 36h, 48h, 60h)

C: Test of the Endo-enzyme and ex-enzyme

(3) TLC를 통한 변환확인

Lactobacillus panaxibrevis DCY65^T균주의 세포내 효소와 PPT계열의 진세노사이드 Rg1, Re, F1, Rh1 과 PPD계열의 진세노사이드 Rb1, F2, Rh2 반응시켰다. 그 결과 TLC 상에서 F1과 C-K 위에서 기존과 다른 spot을 확인할 수 있었다.



A

B

그림. TLC를 통한 ginsenoside PPD 계열 사포닌과 PPT 계열 사포닌 변환 확인

A: S, S1, S2 : saponin standards

Before reaction as control: C1, Re; C2, Rg1; C3, F1; C4, Rh1

After reaction: 1, Re; 2, Rg1; 3, F1; 4, Rh1

B: S, S1, S2 : saponin standards

Before reaction as control: C1, Rb1; C2, F2; C3, Rh2

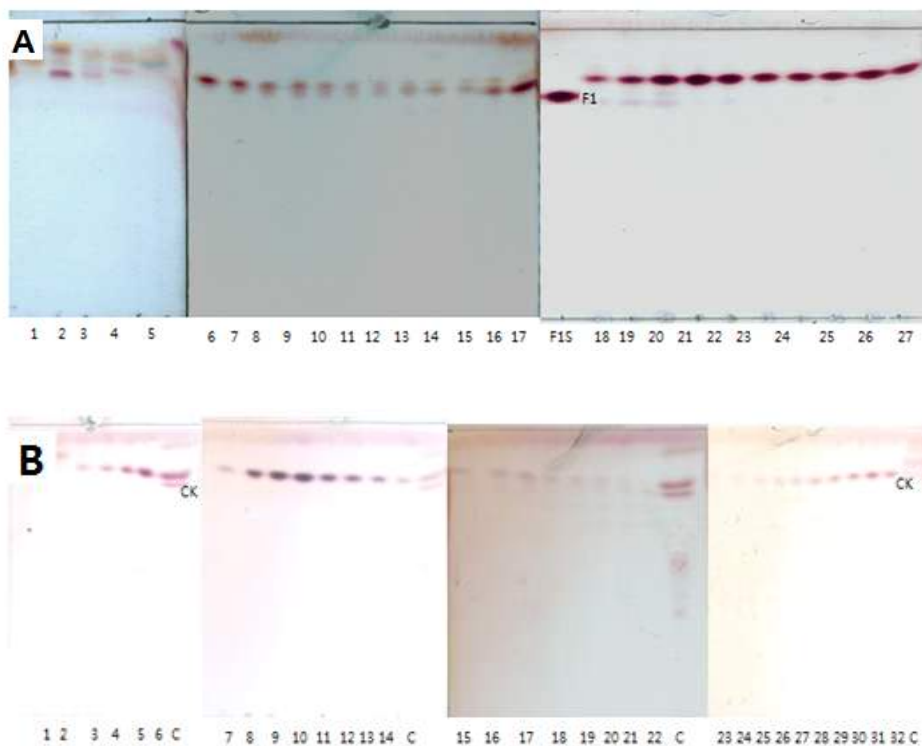
After reaction: 1, Rb1; 2, F2; 3, Rh2

(4) 변환 물질 분리 및 정제

* 3-oxo-F1, 3-oxo-CK 분리

Lactobacillus panaxibrevis DCY65^T 균주를 Plate에 순수 배양하여 MRS broth에 계대하여 균을 키운 후 원심분리 후 셀을 얻었다. buffer 6.8에 녹인 후 Sonication을 5분한 후 세포내 효소를 얻었다. 세포내 효소를 얻고, 각각 F1과 F2를 500mg을 반응시킨 후 Silica gel column chromatography (CHCl₃/MeOH = 13:1~9:1 v/v)를 통하여 정제하였고, TLC로 확인하였다.

1차 정제를 한 후 분리된 사포닌을 당을 제거하기위하여 Diaion HP-20을 이용, 포함되어있는 당을 제거 2차 정제하였다. 그리고 최종적으로 300mg을 각각 얻을 수 있었다.



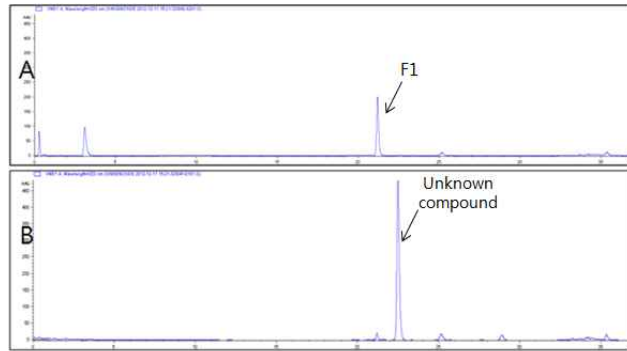
<그림> F1과 F2 반응물질의 분리

A : Reacted F1 and separated unknown compound

B : Reacted F2 and separated unknown compound

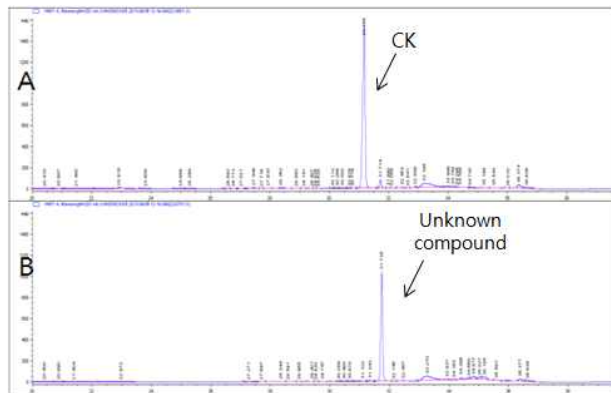
* HPLC

1차 2차 분리 정제된 각각 진세노사이드 F1, unknown spot과 CK, unknown spot을 감압농축 한 후 HPLC를 통하여 순도를 확인하였다.



A: F1
B: after reaction, unknown compound

<그림> F1으로부터 생성된 미지물질의 HPLC 분석



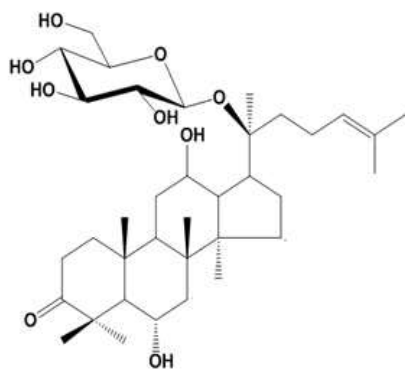
A: CK
B: after reaction, unknown compound

<그림> CK으로부터 생성된 미지물질의 HPLC 분석

(5) NMR을 이용한 구조 동정

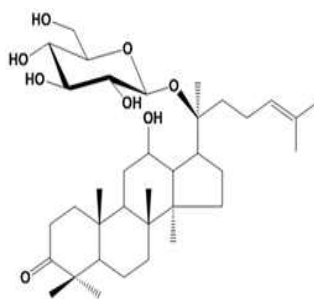
최종적으로 unknown compounds 두 가지 물질을 정확히 동정을 하기위해서 pyridine- d_5 에 녹인후 NMR로 분석 하였다.

본 실험결과, *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65^T균주의 세포내 효소를 사용하여 3-oxo-F1 (Fig. -A)과 3-oxo-CK (Fig.-B)를 각각 얻을 수 있었고 구조식을 아래와 같다 (Fig. 22). 변환 될 수 있는 전환 경로를 Pathway으로 다시 확인해 보았다(Fig). 그 결과 공통적으로 C-3에서 수소 한 분자가 이탈되면서 케톤화가 되어 -C=O기가 생성된 것을 수 있었다. Oxygen-bearing를 가지게 되면 c의 값이 78.5에서 218정도의 값으로 올라가게 되는데 이것이 바로 알콜기가 케톤화 되었다는 증거가 될 수 있다.



6a,12b-dihydroxydammar-3-one-
20(S)-O- β -D-glucopyranoside

A



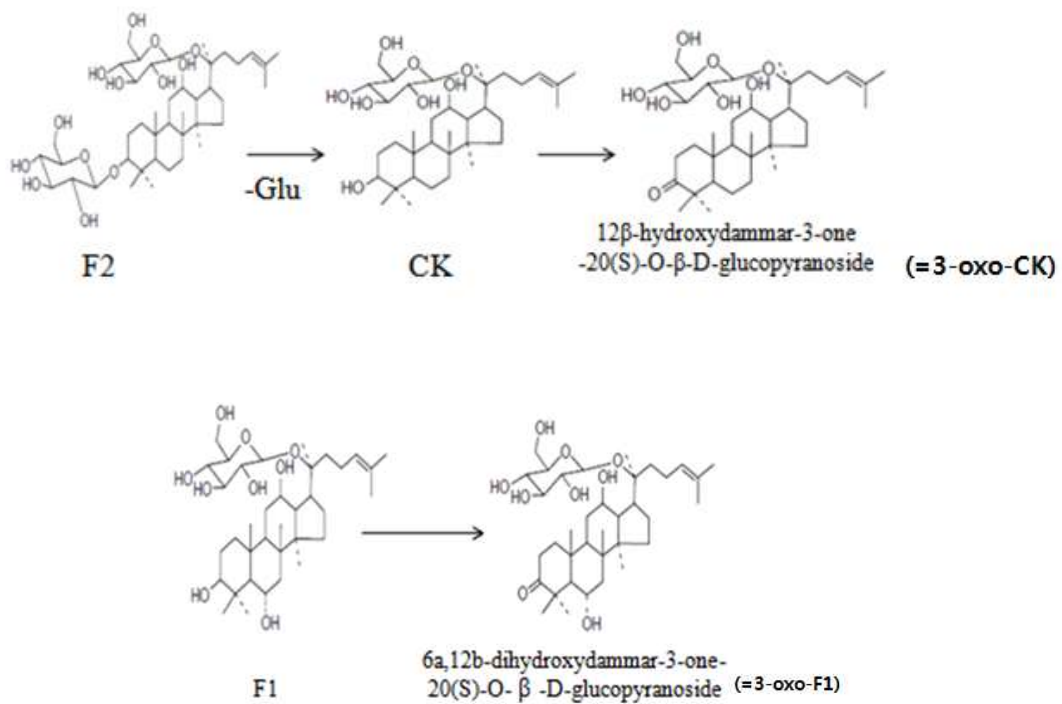
12 β -hydroxydammar-3-one
-20(S)-O- β -D-glucopyranoside

B

<그림> NMR 구조 동정을 통한 구조식 확인

A: 6a,12b-dihydroxydammar-3-one-20(S)-O- β -D-glucopyranoside (3-oxo-F1)

B: 12 β -hydroxydammar-3-one-20(S)-O- β -D-glucopyranoside (3-oxo-CK)



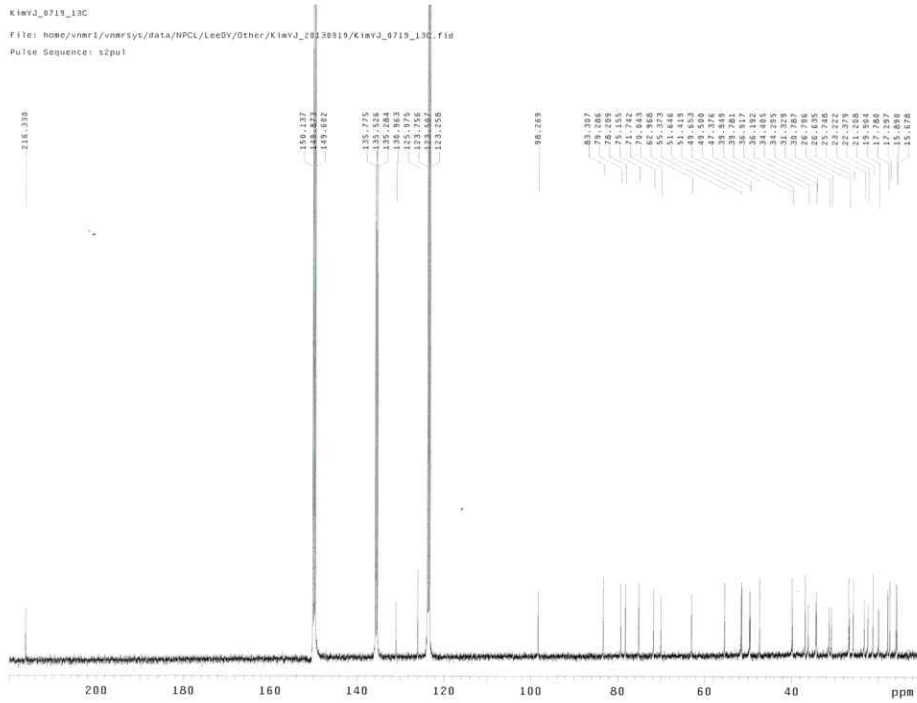
<그림> *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65^T에 의한 ginsenoside F1 및 F2의 변환 대사 경로

그 결과 6a,12b-dihydroxydammar-3-one-20(S)-O-β-D-glucopyranoside 과 12β-hydroxydammar-3-one-20(S)-O-β-D-glucopyranoside 임을 최종적으로 확인하였다.

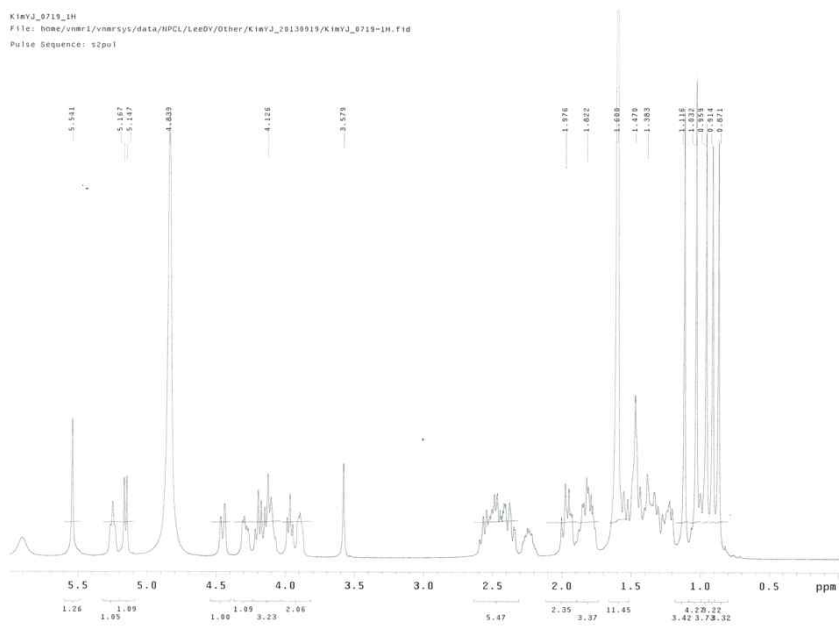
<丑> ^{13}C -NMR spectrum.

6a,12b-dihydroxydammar-3-one-20(S)-O- β -D-glucopyranoside

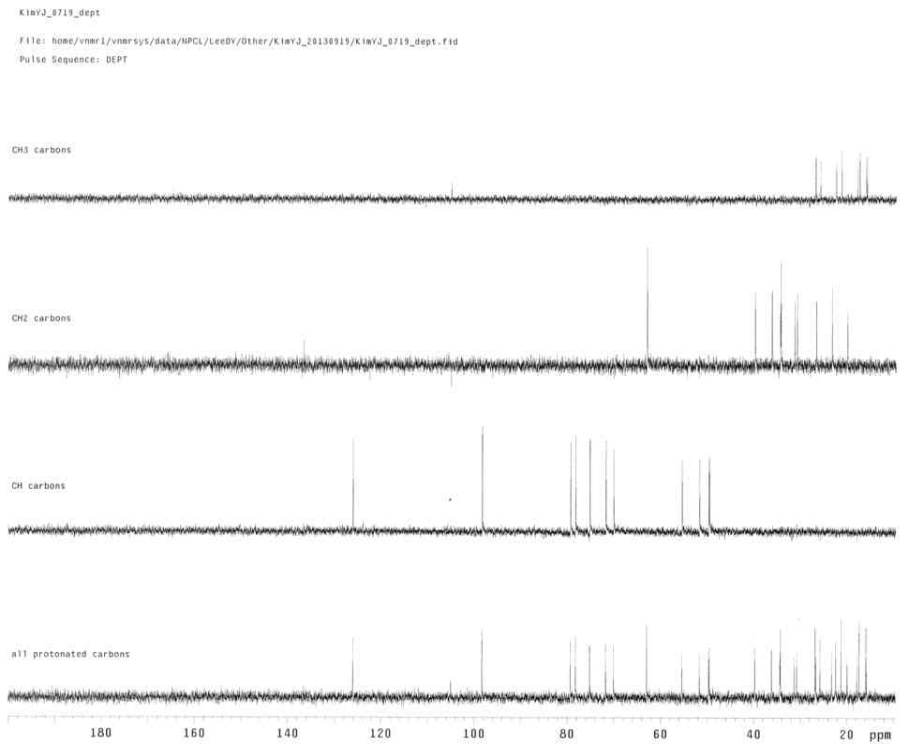
Carbon site	Material	Carbon site	Material
	3-oxo-F1		3-oxo-F1
aglycone		sugar moiety	
C-1	39.3	20-O-inner-Glc	
C-2	33.3	C-1'	98.2
C-3	218.5	C-2'	75.1
C-4	47.7	C-3'	79.3
C-5	59.1	C-4'	71.8
C-6	66.8	C-5'	78.2
C-7	47.4	C-6'	63
C-8	41.4		
C-9	49.8		
C-10	39.3		
C-11	30.8		
C-12	70.9		
C-13	49.1		
C-14	51.4		
C-15	30.7		
C-16	26.5		
C-17	51.6		
C-18	17.3		
C-19	17.7		
C-20	83.3		
C-21	22.3		
C-22	36		
C-23	23.15		
C-24	125.9		
C-25	131		
C-26	25.6		
C-27	17.8		
C-28	31.9		
C-29	16.3		
C-30	17.8		



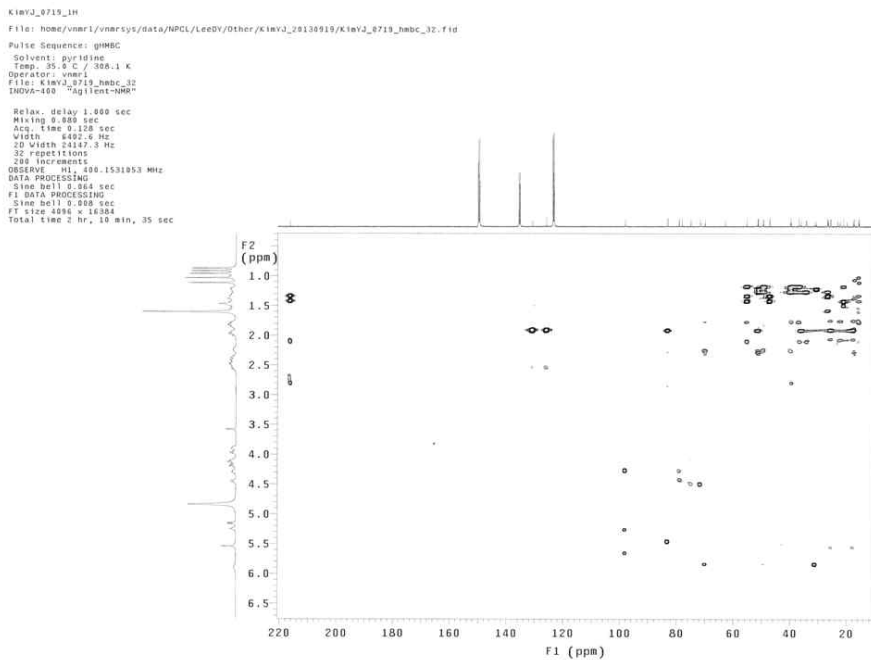
<그림> 3-oxo-F1의 ^{13}C -NMR spectrum



<그림> 3-oxo-F1의 ^1H -NMR spectrum



<그림> 3-oxo-F1의 Two methyl proton carbon spectrum



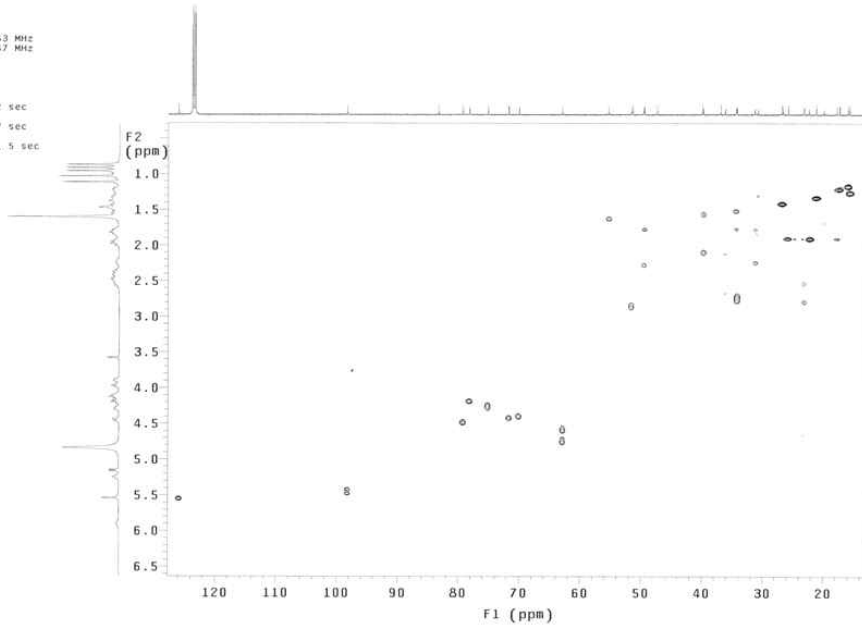
<그림> 3-oxo-F1의 gHMBC spectrum

```

KimVJ_0719_hsqc
File: home/vnmr1/vnmrsys/data/NPCL/LeeDY/Other/KimVJ_20130919/KimVJ_0719_hsqc.Fid
Pulse Sequence: gHSQC
Solvent: pyridine
Temp: 35.0 C / 308.1 K
Operator: vnmr1
File: KimVJ_0719_hsqc
INDVA=400 "Agilent-MMR"

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.189 sec
Width 4092.0 Hz
2D Width 17195.0 Hz
16 repetitions
2 x 128 increments
OBSERVE M1, 400.1531053 MHz
DECOUPLE z15, 100.6261247 MHz
Power 47 dB
on during acquisition
off during delay
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.092 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.007 sec
F1 size 4096 x 2048
Total time 1 hr, 26 min, 5 sec

```

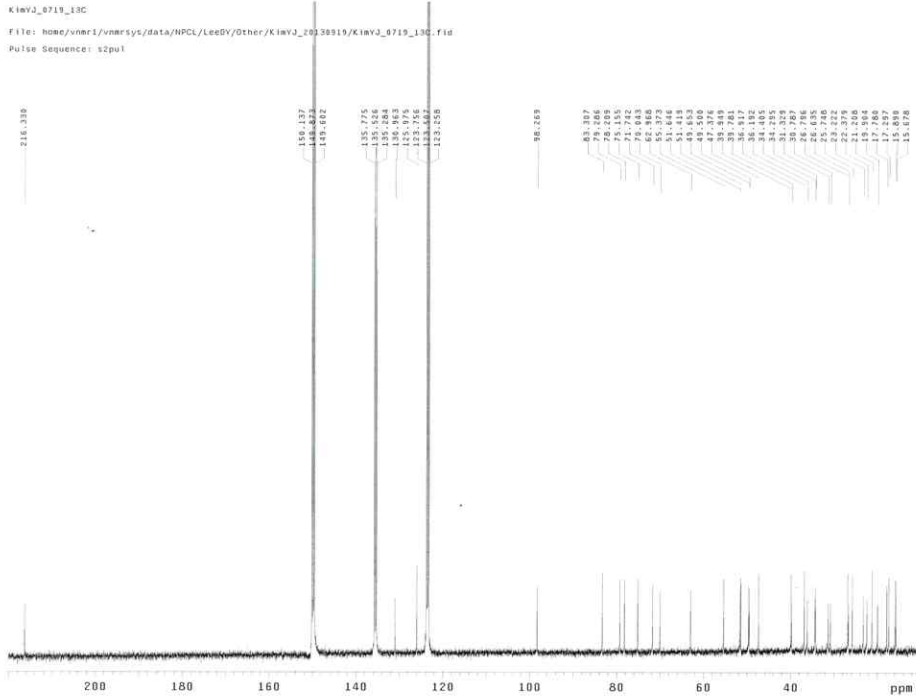


<그림> 3-oxo-F1 의 gHSQC spectrum

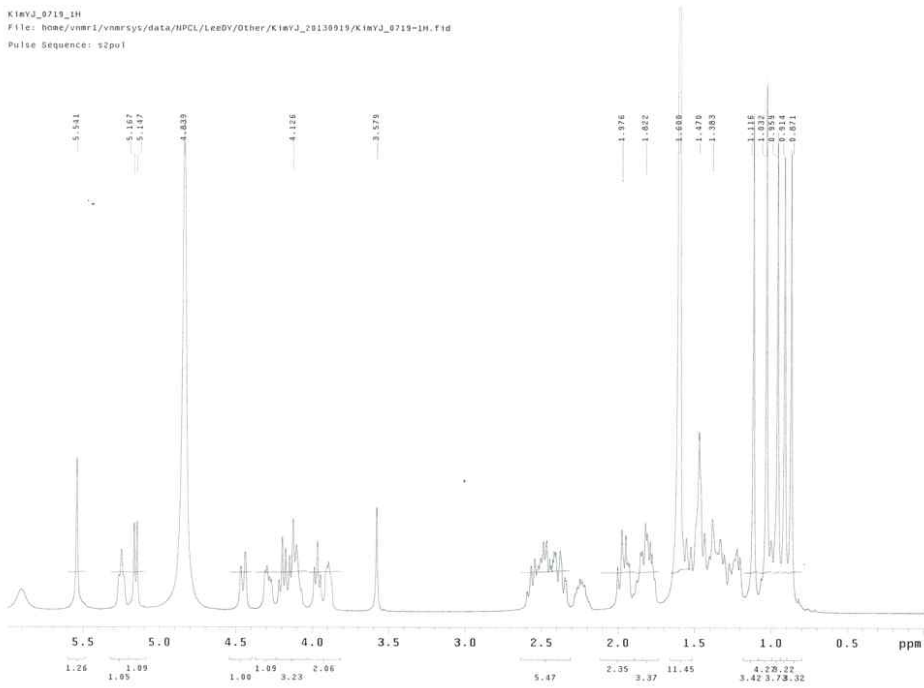
<丑> ^{13}C -NMR spectrum

12 β -hydroxydammar-3-one-20(S)-O- β -D-glucopyranoside

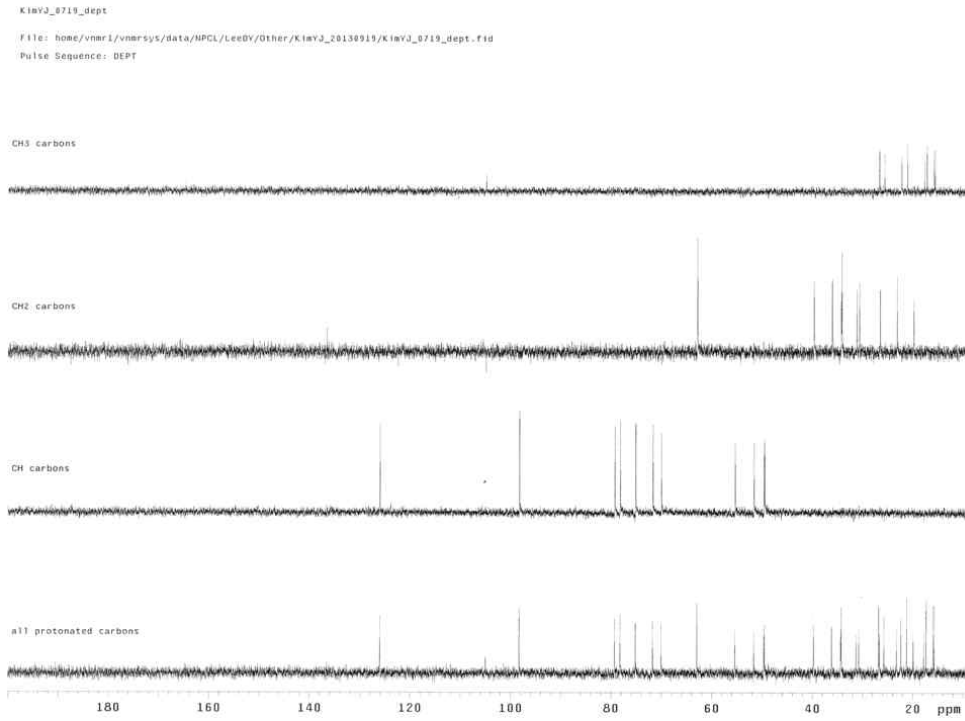
Carbon site	Material	Carbon site	Material
aglycone	3-oxo-CK	sugar moiety	3-oxo-CK
C-1	39.7	20-O-inner-Glc	
C-2	34.3	C-1'	98.2
C-3	216.4	C-2'	75.1
C-4	47.3	C-3'	79.3
C-5	55.2	C-4'	71.6
C-6	19.8	C-5'	78.3
C-7	34.3	C-6'	62.8
C-8	39.8		
C-9	49.6		
C-10	36.8		
C-11	31.2		
C-12	69.9		
C-13	49.4		
C-14	51.3		
C-15	30.7		
C-16	26.5		
C-17	51.4		
C-18	15.6		
C-19	15.9		
C-20	83.2		
C-21	22.3		
C-22	36.1		
C-23	23.1		
C-24	125.9		
C-25	130.9		
C-26	25.8		
C-27	17.7		
C-28	26.7		
C-29	21.2		
C-30	17.2		



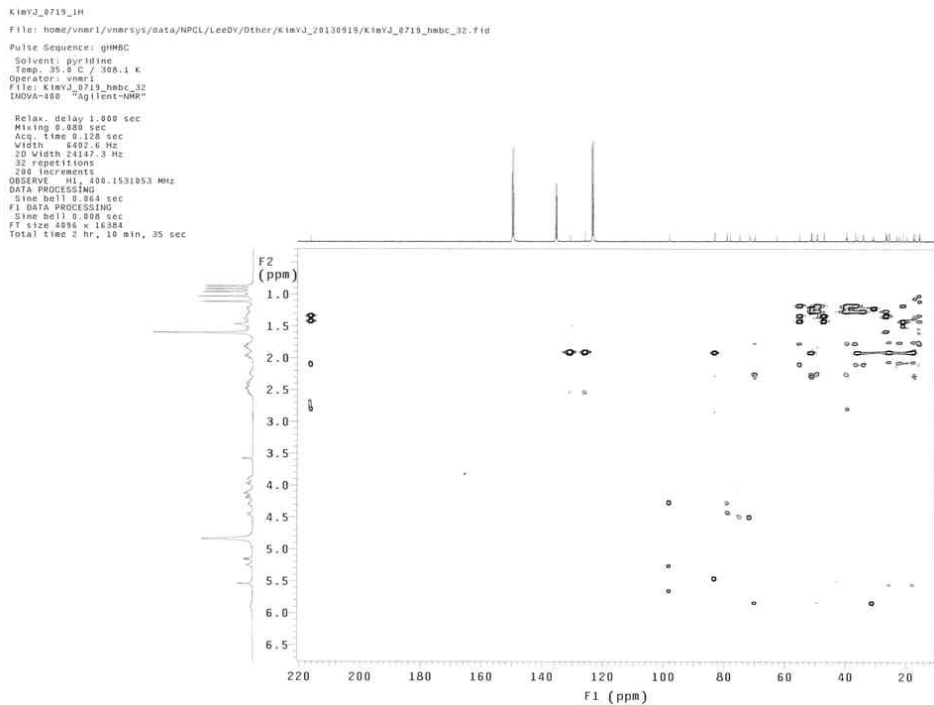
<그림> 3-oxo-CK의 ^{13}C -NMR spectrum



<그림> 3-oxo-CK의 ^1H -NMR spectrum



<그림> 3-oxo-CK의 Two methyl proton carbon spectrum

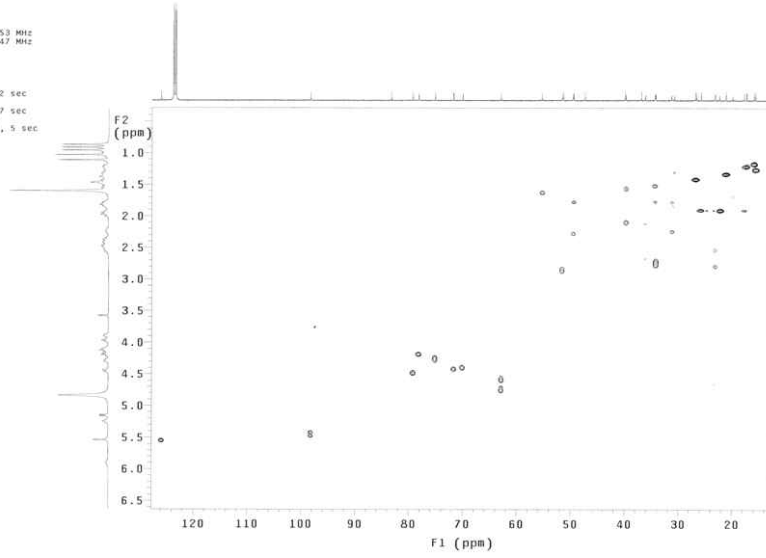


<그림> 3-oxo-CK의 gHMBC spectrum

```

K1wVJ_0719_hsqc
File: home/vmr1/vmr/sys/data/NPCL/LeDeV/Other/K1wVJ_20130919/K1wVJ_0719_hsqc.fid
Pulse Sequence: gHSQC
Solvent: pyridine
Temp: 35.0 C / 308.1 K
Operator: vmr1
File: K1wVJ_0719_hsqc
INVA=400 "Agilent-HMA"
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 3.139 sec
Width 6402.6 Hz
2D Width 17105.0 Hz
16 repetitions
2 x 320 increments
OBSERVE F1, 400.1531053 MHz
DECOUPLE C15, 100.6261247 MHz
Power 47 dB,
on during acquisition
off during delay
GARP-I modulated
DATA PROCESSING
Gauss approximation 0.092 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss approximation 0.007 sec
FT size 4096 x 2048
Total time 1 hr, 26 min, 5 sec

```



<그림> 3-oxo-CK의 gHSQC spectrum

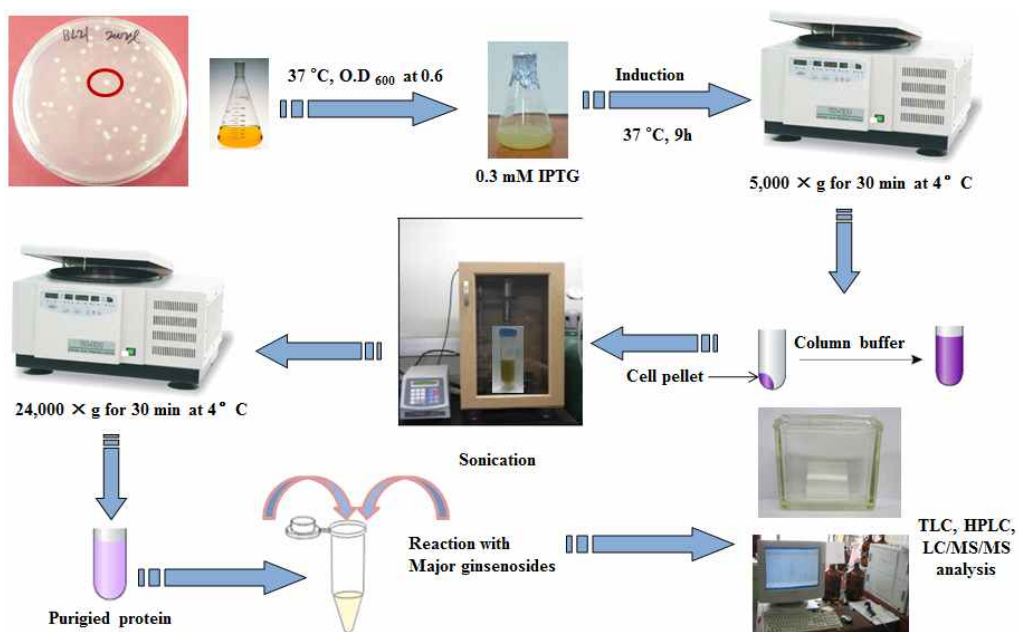
3절. 유전공학 기술을 활용한 Minor 사포닌 대량 생산 체계 확립

본 과제와 3협동 과제와 연계하여 균주의 최적 발효 조건을 탐색하고 이의 발효조건을 확립하여 산업적 대량생산을 하기 위해 기초 연구를 수행 하였다.

(1) *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65의 사포닌 대량 생산 system 확립

본 과제에서는 식품에서 이용하기 위한 균주의 직접적인 이용을 이용한 발효 개념의 사포닌 전환 뿐 아니라 화장품 및 의약품에 응용할 수 있는 소재를 대량화 하기 위하여 인삼 사포닌 전환 활성이 뛰어난 균주로부터 활성 유전자를 클로닝하여 대량으로 발현시켜 물질을 전환시켜 보고자 하였다.

특히, 본 *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65의 경우 C-K의 생성 뿐 아니라 신규한 사포닌을 생성하는 능력이 검정 된 바 이를 타겟으로 하여 신규 사포닌을 대량으로 생성할 수 있는 유전자를 발굴하고 이를 통하여 사포닌을 대량으로 생산하는 system을 확립하였다. 분리 되어진 *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65의 DNA를 추출하고 사포닌을 전환 시키는 유전자를 선발하여 클로닝을 진행 하였다.

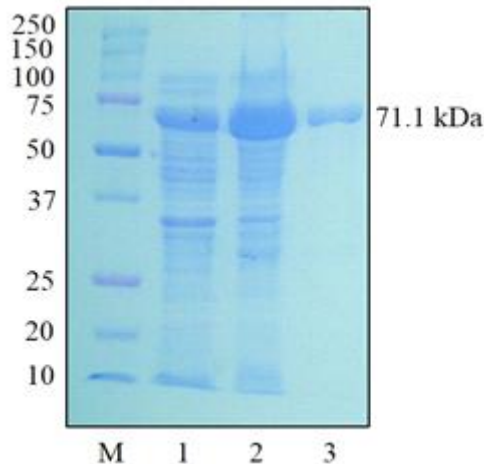


<그림> *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65의 사포닌 대량 생산 system 확립

① 신규 사포닌 생성을 위한 대량 생산 system 확립

<시험방법>

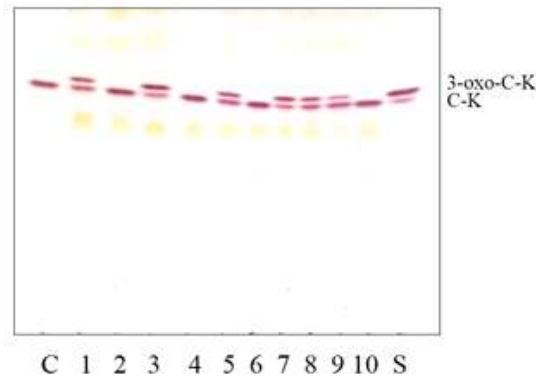
3 β -HSD로 명명한 본 유전자 클론은 genomic DNA로부터 polymerase chain reaction (PCR) with *Pfu* DNA polymerase 수행을 통하여 insert DNA를 얻고 이를 *Nde*I 와 *Eco*RV를 이용하여 절단된 pMAL-c5X vector에 ligation 하여 이를 *E.coli*에 재조합 하였다. *Escherichia coli* BL21 (DE3)에 재조합된 recombinant pMAL-HSDLb1은 LB-ampicillin broth를 이용하여 37 ° C하에서 OD600 0.5가 될 때 까지 인큐베이션 한 후, protein expression을 유도하기 위하여 0.3 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 넣어 induction 시켰다. r 추가적으로 28 ° C에서 12시간 배양한 후 원심분리(5,000 x g for 20 min at 4 ° C)를 통하여 cell을 수거하였으며 이 cell은 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4, 1 mM EDTA and 1 mM NaCl)를 이용하여 2번 세척 한 후 최종적으로 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 ultrasonication 하여 cell을 파쇄 시켜 protein을 용출 시켜 활용하였다. MBP-tagged fusion protein은 amylose resin column (New England BioLabs, UK)을 이용하여 정제 하였고 이는 12 % SDS-PAGE를 통하여 확인하였다.



<그림> 클로닝을 이용한 신규 사포닌 생성 효소의 대량 발현

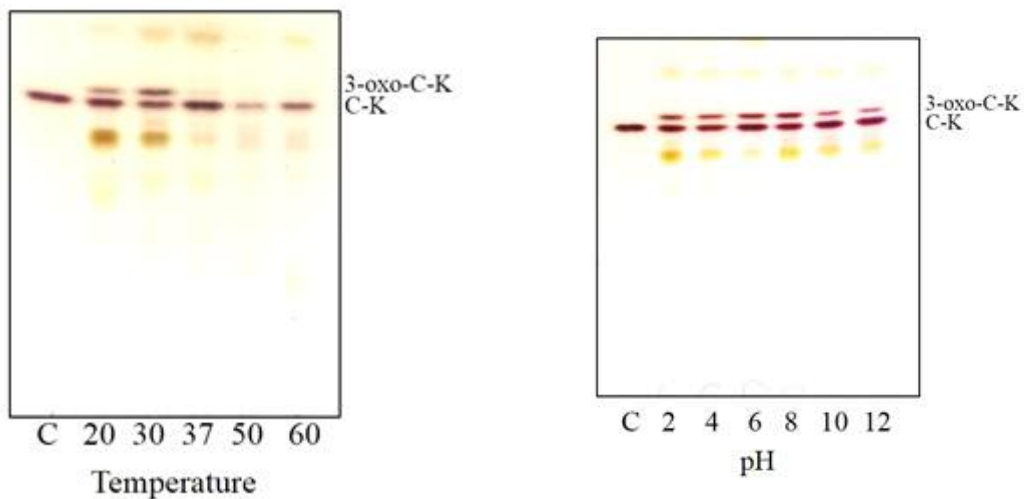
M, molecular mass marker; 1, uninduced crude extract; 2, crude extract of induced recombinant BL21 (DE3) cells carrying pMAL-HSDLb1; 3, pMAL-HSDLb1 after purification with the MBP-bind agarose resin.

분리된 recombinant HSDLb1 효소의 특성을 확인하기 위하여 Enzyme의 특성을 검정하였다. metal ions에 대한 영향을 확인해 본 결과 본 enzyme은 10 mM Co²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ 농도에서 효소활성을 저해 받는 것으로 확인 되었으며 Na⁺, K⁺ 에 의 해서도 저해를 받을 수 있는 것을 확인하였다. NH₄⁺ and Mg²⁺의 경우 효소 활성을 더욱 증가시켜주는 효과를 나타내는 것으로 나타났다.



<그림> metal ions과 chemical reagents에 의한 효소 활성 변화

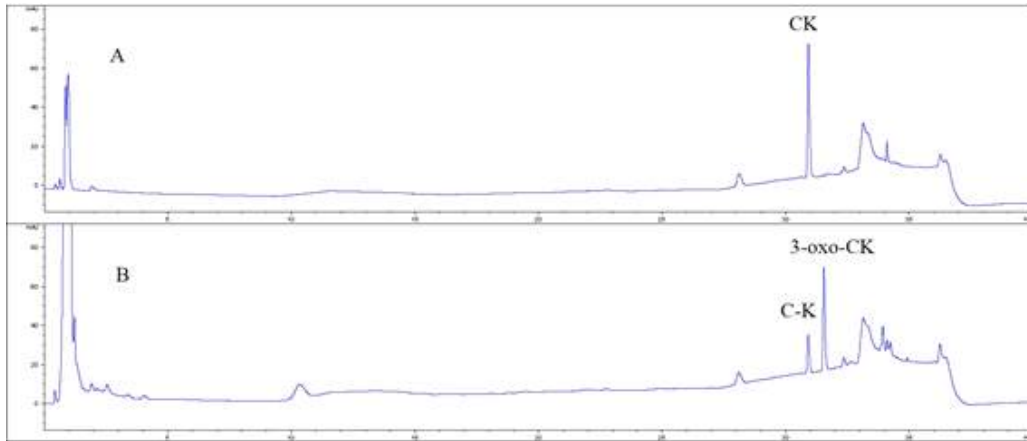
C, Control; 1, no metal ions and chemical agent; 2, CoCl₂; 3, MgCl₂; 4, FeCl₃; 5, NaCl; 6, CuSO₄; 7, NH₄Cl; 8, KCl; 9, CaCl₂; 10, ZnSO₄.



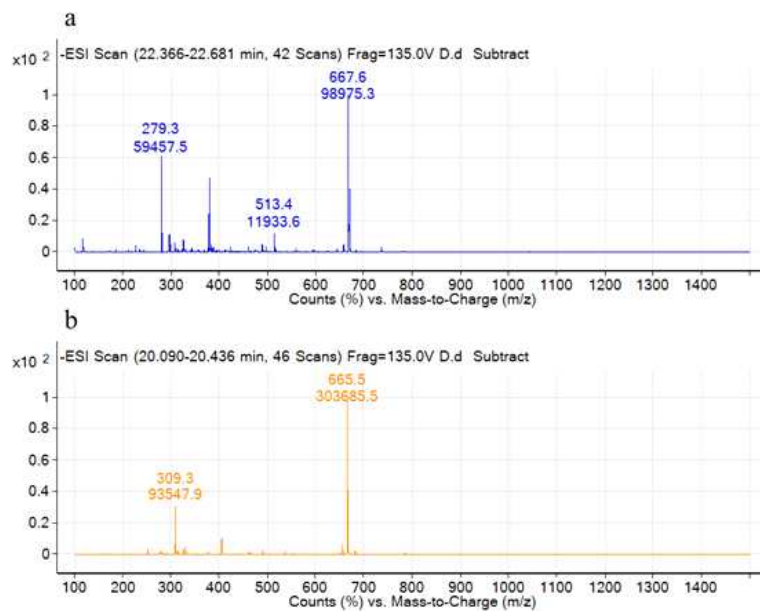
<그림> 온도와 pH에 의한 효소활성 변화

효소의 최적 온도와 pH 조건은 위의 그림과 같이 20-30 ° C로 나타났으며 30 ° C 이상의 온도에서는 효소활성이 나타나지 않는 것을 확인 할 수 있었다. HSDLb1은 transformed ginsenoside CK 를 3-oxo-CK를 확인한 모든 pH 범위에서 전환시키

는 것을 확인 할 수 있었으며, pH 6.0 과 8.0 사이에서 가장 뛰어난 전환 활성을 가지는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 효소의 최적 활성 조건은 10 mM Mg²⁺, pH 6.0-8.0 and 30 ° C 로 설정하여 활용하였다.



생성 된 효소를 이용하여 물질을 전환 시켜 본 결과, ginsenoside CK 를 3-oxo-CK 로 전환 하는 것을 확인 할 수 있었으며, 이는 LC/MS를 통한 재검증을 통해 정성적인 분석을 완료하였다.



② Rg2 사포닌 생성 대량 생산 system 확립

GH3로 명명한 본 유전자 클론은 genomic DNA로부터 polymerase chain reaction (PCR) with *Pfu* DNA polymerase 수행을 통하여 insert DNA를 얻고 이를 *Nde*I 와 *Eco*RV를 이용하여 절단 된 pMAL-c5X vector에 ligation 하여 이를 *E.coli*에 재조합 하였다 *Escherichia coli* BL21 (DE3)에 재조합된 recombinant pMAL-HSDLb1은 LB-ampicillin broth를 이용하여 37 ° C하에서 OD600 0.5가 될 때 까지 인큐베이션 한 후, protein expression을 유도하기 위하여 0.3 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 넣어 induction 시켰다. r 추가적으로 28 ° C에서 12시간 배양한 후 원심분리(5,000 x g for 20 min at 4 ° C)를 통하여 cell을 수거하였으며 이 cell은 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4, 1 mM EDTA and 1 mM NaCl)를 이용하여 2번 세척 한 후 최종적으로 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 ultrasonication 하여 cell을 파쇄 시켜 protein을 용출 시켜 활용하였다. MBP-tagged fusion protein은 amylose resin column (New England BioLabs, UK)을 이용하여 정제 하였고 이는 12 % SDS-PAGE를 통하여 확인하였다.

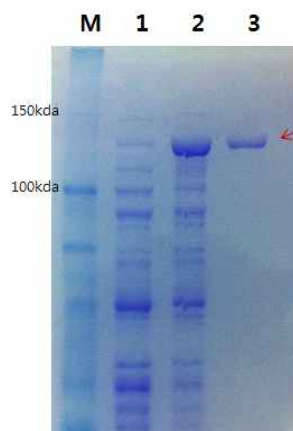


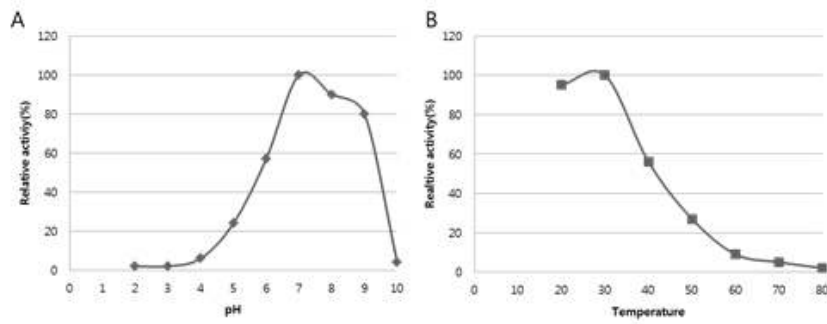
Table . Purification of Recombinant GH3 expressed in *E. coli* BL21(DE3)

purification step	total protein (mg)	activity (U/mg)	specific activity (U/mg)	purification (fold)	yield(%)
crude extract	86.1	1579.2	18.34	1.0	100
pMAL binding column	8.3	1330.6	160.31	8.9	14.28

a One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme which released 1uMol *p*-nitrophenol per minute.

lane 1, crude extract of uninduced BL21 (DE3) cells carrying pMAL-GH3
 lane 2, crude extract of induced recombinant BL21 (DE3) cells showing pMAL-GH3
 lane 3, purified GH3 protein eluted from the second amylose column.

<그림> 클로닝을 이용한 Rg2 전환 효소의 대량 발현

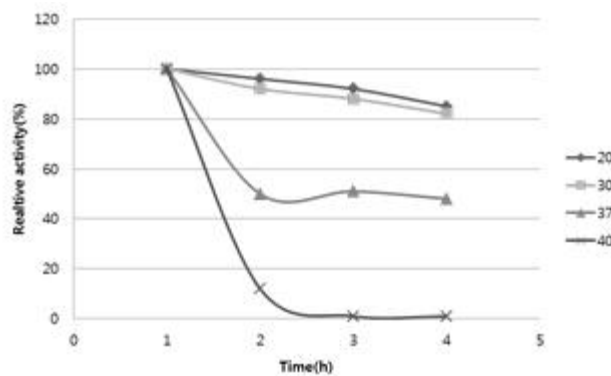
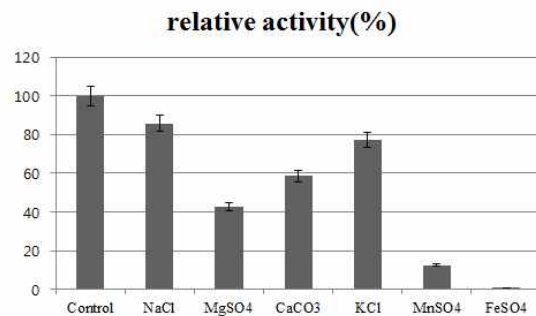


<그림> 전환 효소의 최적 전환 조건 탐색

효소의 최적 온도와 pH 조건은 위의 그림과 같이 20-30 ° C로 나타났으며 30 ° C 이상의 온도에서는 효소활성이 급격히 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.

substance	relative activity(%)
Control	100
NaCl	85.8
MgSO ₄	42.5
CaCO ₃	58.5
KCl	77.4
MnSO ₄	12.3
FeSO ₄	0.9

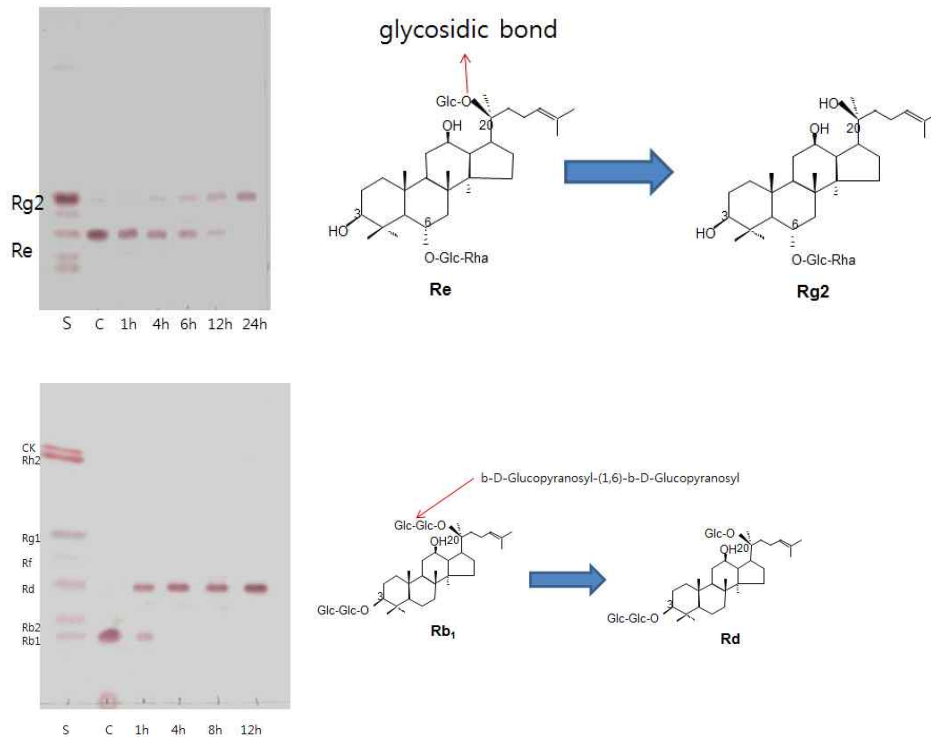
a One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme which released 1 μ Mol *p*-nitrophenol per minute.



<그림> 전환 효소의 최적 전환 조건 탐색

효소의 안정성 시험 결과 20-30 ° C에서 비교적 높은 안정성을 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 효소의 최적 조건은 30 ° C, pH 7.0로 설정하여 활용하고자 하였다.

본 효소를 이용하여 각각 Rb1과 Rg1을 반응시켜 본 결과 Rb1의 경우 Rd를 생성하고, Re의 경우 Rg2를 생성하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 두 물질 모두 C-20위치의 결합된 바깥쪽 당 1개만을 전환 시키는 활성으로 본 연구를 통해 생성 시킨 효소가 C-20 위치에 특이적으로 작용하는 것을 의미하는 것으로 Rd 및 Rg2를 특이적으로 생성을 필요로 할 때 유용하게 사용 될 것으로 사료된다.



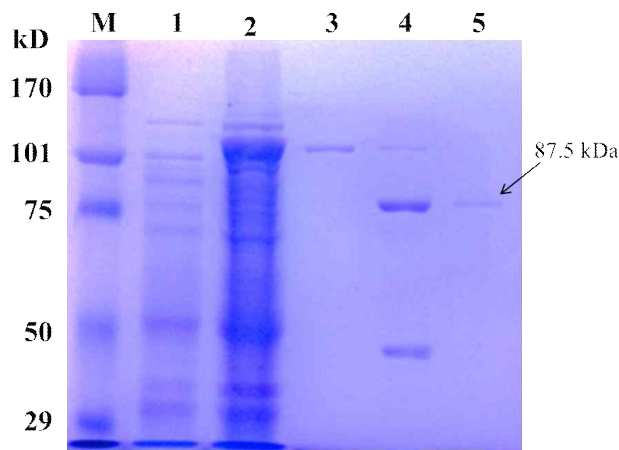
<그림> 발현 효소를 이용한 사포닌의 전환

(2) *M. esteraromaticum* GS514의 사포닌 대량 생산 system 확립

① bgp1을 클로닝을 통한 Rg3 생성 효소의 대량 생산

bgp1로 명명한 본 유전자 클론은 genomic DNA로부터 polymerase chain reaction (PCR) with *Pfu* DNA polymerase 수행을 통하여 insert DNA를 얻고 이를 pMAL-c5X vector에 ligation 하여 이를 *E.coli*에 재조합 하였다 *Escherichia coli* BL21 (DE3)에 재조합된 recombinant pMAL-HSDLb1은 LB-ampicillin broth를 이용하여 37 ° C하에서 OD600 0.5가 될 때 까지 인큐베이션 한 후, protein expression을 유도하기 위하여 0.3 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside

(IPTG)를 넣어 induction 시켰다. r 추가적으로 28 ° C에서 12시간 배양한 후 원심분리(5,000 x g for 20 min at 4 ° C)를 통하여 cell을 수거하였으며 이 cell은 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4, 1 mM EDTA and 1 mM NaCl)를 이용하여 2번 세척 한 후 최종적으로 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 ultrasonication 하여 cell을 파쇄 시켜 protein을 용출 시켜 활용하였다. MBP-tagged fusion protein은 amylose resin column (New England BioLabs, UK)을 이용하여 정제 하였고 이는 12 % SDS-PAGE를 통하여 확인하였다.



<그림> 클로닝을 이용한 Rg3 전환 효소의 대량 발현

lane 1, uninduced BL21 (DE3) cells carrying pMAL-Bgp1;

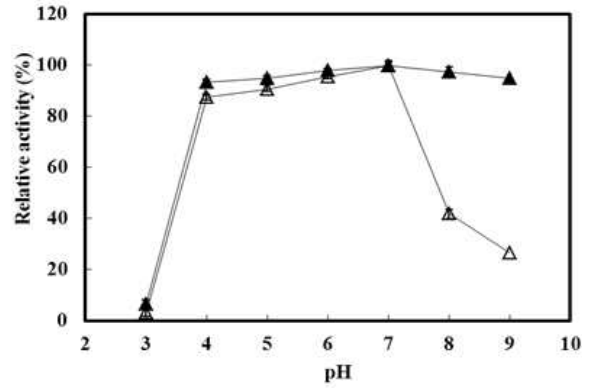
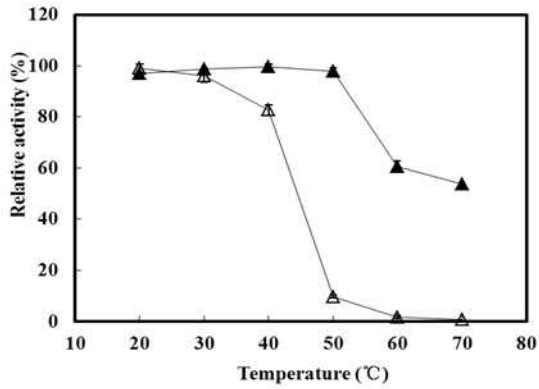
lane 2, induced recombinant BL21 (DE3) cells showing pMAL-Bgp1 expression at ~130 kDa;

lane 3, amylose affinity purified pMAL-Bgp1 (~130 kDa);

lane 4, factor Xa digested fusion protein showing Bgp1 (~87.5 kDa) and MBP (~42.5 kDa);

lane 5, purified Bgp1 protein (~87.5 kDa) eluted from the second amylose column.

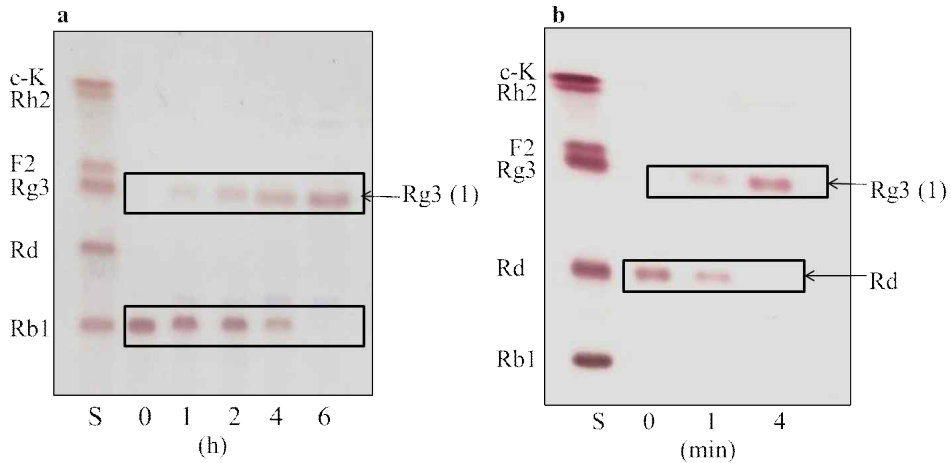
효소의 최적 온도와 pH 조건은 위의 그림과 같이 40-50 ° C로 나타났으나 40 ° C 이상의조건에서는 안정성이 급격히 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. pH의 경우 7.0 수준에서 안정함을 확인 한 바, 본 효소의 최적 조건은 pH 7.0, 40 ° C 이하로 설정하였다.



<그림> Rg3 전환 효소의 최적 전환 조건 탐색

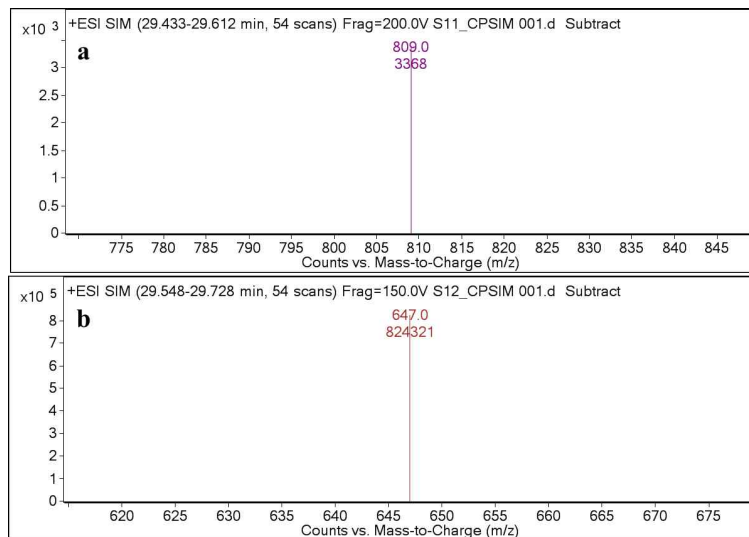
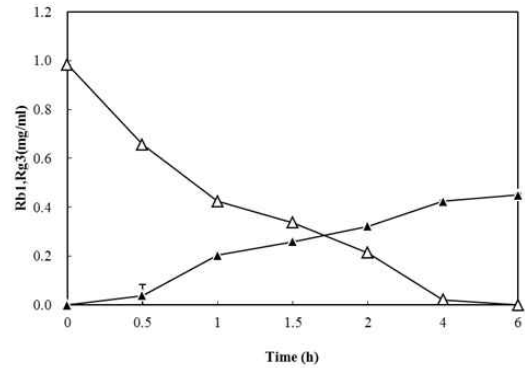
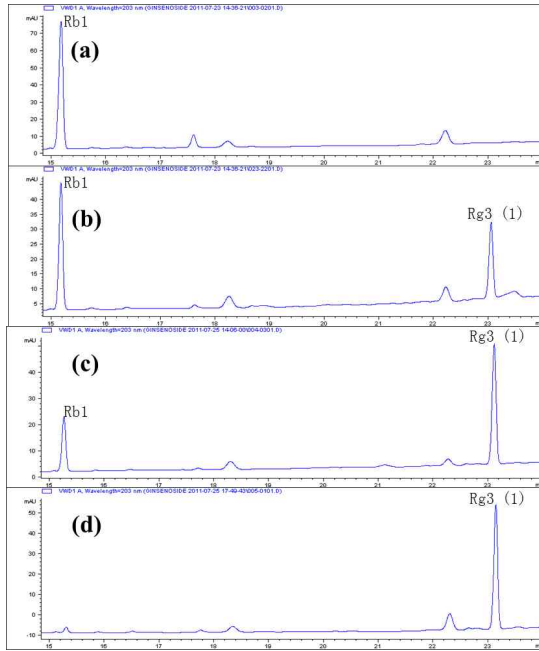
▲, enzyme activity. Maximum activity observed at 40° C was taken as 100%.

△, stability. Enzyme activity was assayed under standard conditions (pH 7.0, 20° C) after incubation at 40° C for 4 h at different temperatures.



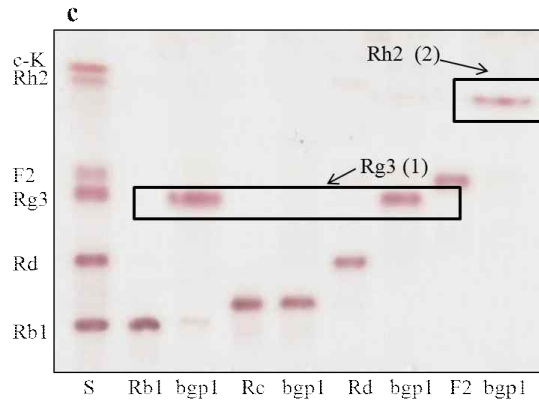
<그림> TLC를 통한 전환 물질의 확인

본 효소를 이용하여 각각 Rb1과 Rd를 반응 시켜 본 결과, 모두 Rg3를 생성하는 것으로 확인 되었다. 이는 대부분의 효소가 F2를 거쳐 C-K를 생성하는 기존의 결과와 달리 효소학적으로도 Rg3를 생성할 수 있음을 의미하며, 일반적인 Rg3 생성 방법인 열처리의 경우 isomer와 같은 부반응을 동반 하지만, 본 시험 효소의 경우 Rg3(s)를 선택적으로 생산하기 때문에 효율성이 높을 것으로 기대 된다.



〈그림〉 HPLC 및 LC/MS를 통한 전환 물질의 확인

생성 된 효소를 이용하여 물질을 전환 시켜 본 결과, ginsenoside Rb1를 Rg3로 전환 하는 것을 확인 할 수 있었으며, 이는 LC/MS를 통한 재검증을 통해 정성적인 분석을 완료하였다. 정량 결과 본 효소는 Rb1 1mg을 이용하여 약 0.5mg이 Rg3를 생성 하는 바, 분자량을 감안한 수율을 계산시 90% 이상의 뛰어난 전환 효율을 나타내는 것을 확인 할 수 있었으므로 상업적으로 유용하게 활용 할 수 있을 것으로 판단된다.

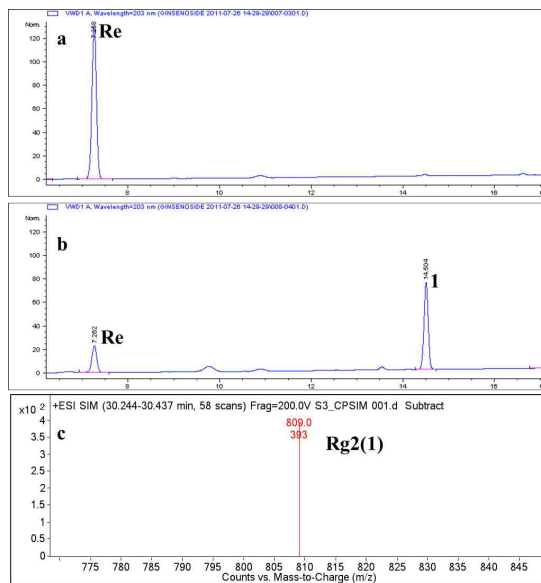


<그림> 기질 종류별 효소 전환 양상 확인

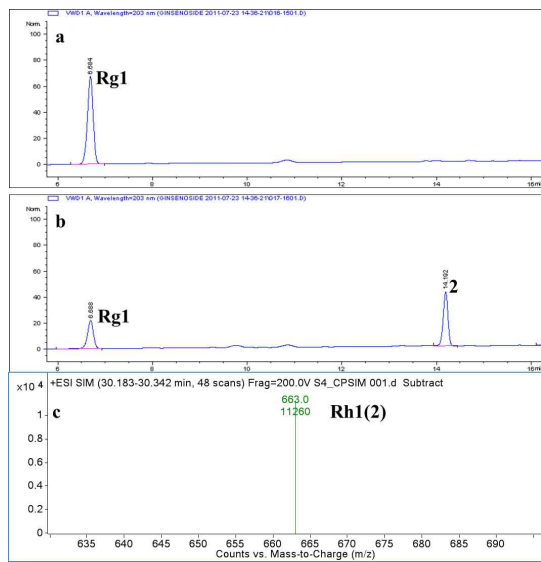
더불어 F2를 기질로 이용할 경우, 특이적으로 Rh2를 생성하는 것을 확인 할 수 있으며, 이를 통하여 본 1종류의 효소를 이용하여 기질의 달리하여 각각 Rg3와 Rh1을 모두 생성할 수 있을 것으로 판단되었다.

② bgp1 효소의 PPT 계열 사포닌 전환 확인

Rg3를 전환 시키는데 있어서 탁월한 효과를 가진 bgp1 효소를 이용하여 인삼의 PPT 계열 major 사포닌인 ginsenoside Re와 Rg1의 전환 효과를 확인해 보고자 하였다. 앞선 실험과 동일한 방법으로 효소와 ginsenoside를 각각 반응 시켜보았으며 그 결과를 분석하여보았다.

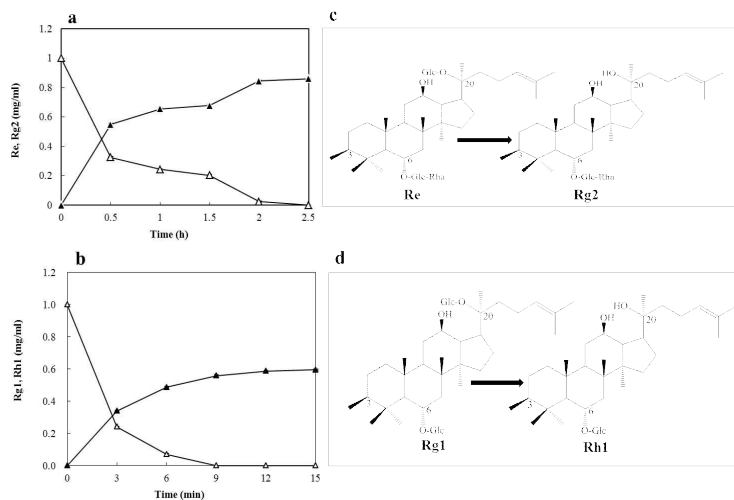


<그림> bgp1의 ginsenoside Re의 Rg2로의 전환



<그림> bgp1의 ginsenoside Rg1의 Rh1로의 전환

시험 결과 Re의 경위 Rg2로 전환 됨을 확인 할 수 있었으며, Rg1의 경위 Rh1으로 전환 되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Re와 Rg1의 C-20에 결합되어진 glucose를 분해시켜 일어날 수 있는 pathway로 PPD계열의 Rb1과 Rd의 C-20위치의 glucose를 분해시켜 Rg3로 전환시키는 것과 동일한 기작이라고 할 수 있어, 본 효소는 C-20 위치의 당을 떨어뜨리는데 있어서 탁월함을 다시 한번 확인하였다.

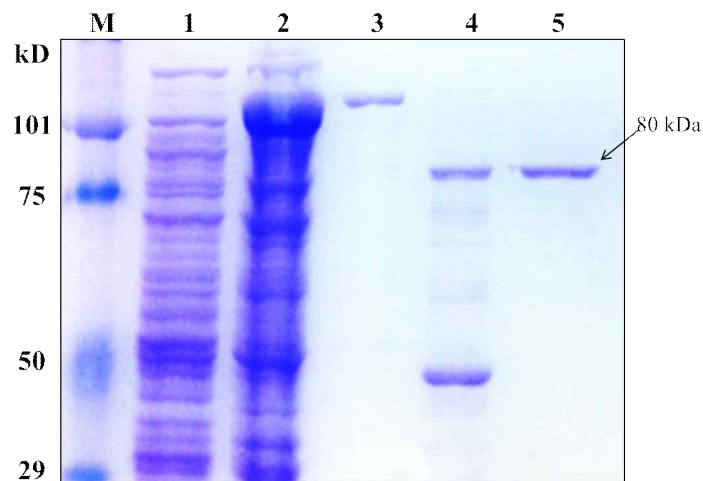


<그림> HPLC 및 LC/MS를 통한 전환 물질의 확인

정량 결과 본 효소는 Re 1mg을 이용하여 약 0.8mg이 Rg2를 생성 하는 바, 분자량을 감안한 수율을 계산시 90% 이상의 뛰어난 전환 효율을 나타내는 것을 확인 할 수 있었으며 Rg1을 Rh1으로 전환시에도 약 80% 전환율을 보여 상업적으로 유용하게 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

③ bgp3을 클로닝을 통한 C-K 생성 효소의 대량 생산

bgp3로 명명한 본 유전자 클론은 genomic DNA로부터 polymerase chain reaction (PCR) with *Pfu* DNA polymerase 수행을 통하여 insert DNA를 얻고 이를 pMAL-c5X vector에 ligation 하여 이를 *E.coli*에 재조합 하였다 *Escherichia coli* BL21 (DE3)에 재조합된 recombinant pMAL-HSDLb1은 LB-ampicillin broth를 이용하여 37 ° C하에서 OD600 0.5가 될 때 까지 인큐베이션 한 후, protein expression을 유도하기 위하여 0.3 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 넣어 induction 시켰다. r 추가적으로 28 ° C에서 12시간 배양한 후 원심분리(5,000 x g for 20 min at 4 ° C)를 통하여 cell을 수거하였으며 이 cell은 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4, 1 mM EDTA and 1 mM NaCl)를 이용하여 2번 세척 한 후 최종적으로 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 ultrasonication 하여 cell을 파쇄 시켜 protein을 용출 시켜 활용하였다. MBP-tagged fusion protein은 amylose resin column (New England BioLabs, UK)을 이용하여 정제 하였고 이는 12 % SDS-PAGE를 통하여 확인하였다.



<그림> 클로닝을 이용한 C-K 전환 효소의 대량 발현

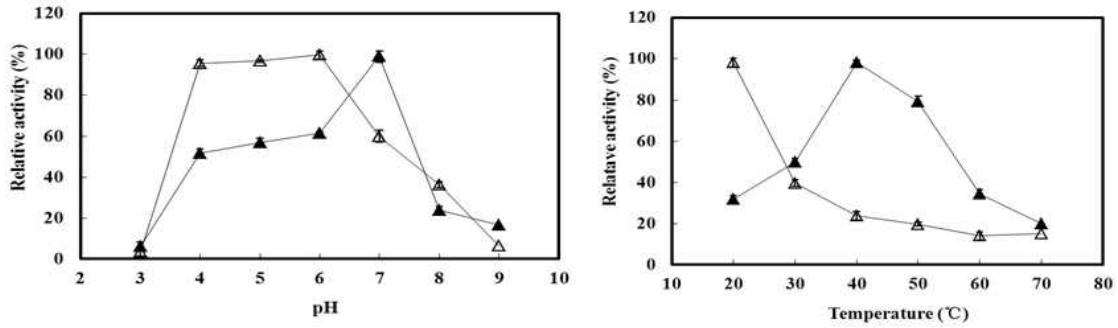
lane 1, uninduced BL21 (DE3) cells carrying pMAL-Bgp3;

lane 2, induced recombinant BL21 (DE3) cells showing pMAL-Bgp1 expression at ~130 kDa;

lane 3, amylose affinity purified pMAL-Bgp1 (~130 kDa);

lane 4, factor Xa digested fusion protein showing Bgp1 (~87.5 kDa) and MBP (~42.5 kDa);

lane 5, purified Bgp1 protein (~87.5 kDa) eluted from the second amylose column.



<그림> C-K 전환 효소의 최적 전환 조건 탐색

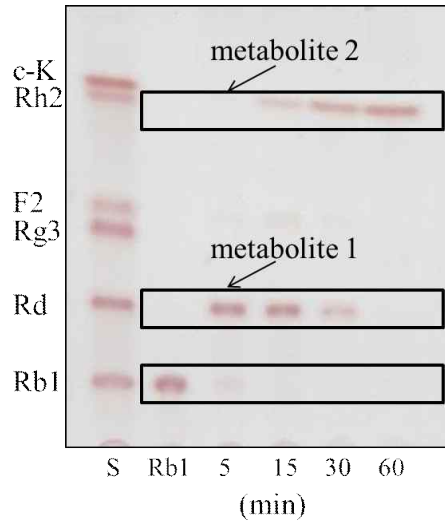
▲, enzyme activity. Maximum activity observed at 40° C was taken as 100%.

△, stability. Enzyme activity was assayed under standard conditions (pH 7.0, 20° C) after incubation at 40° C for 4 h at different temperatures.

효소의 최적 온도와 pH 조건은 위의 그림과 같이 20-30 ° C로 나타났으나 30 ° C 이상의 조건에서는 안정성이 급격히 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. pH의 경우 7.0 수준 뛰어난 활성을 가졌지만 안정성에서 떨어지는 것이 확인되어 활성이 높고 안정성도 확인되는 pH6.5을 최적조건으로 확인하였다. 이에, 본 효소의 최적 조건은 pH 6.5, 37 ° C 이하로 설정하였다. 본 효소의 경우 특이적으로 NaCl 및 KCl과 같은 ion이 첨가될 경우 보다 뛰어난 효소활성을 가지는 것을 확인 할 수 있었으며 NaCl 10mM 첨가시 약 10%의 효소 활성 증대를 확인한 바 효소의 활성을 보다 극대화 시키기 위하여 이를 첨가하여 반응에 활용하였다.

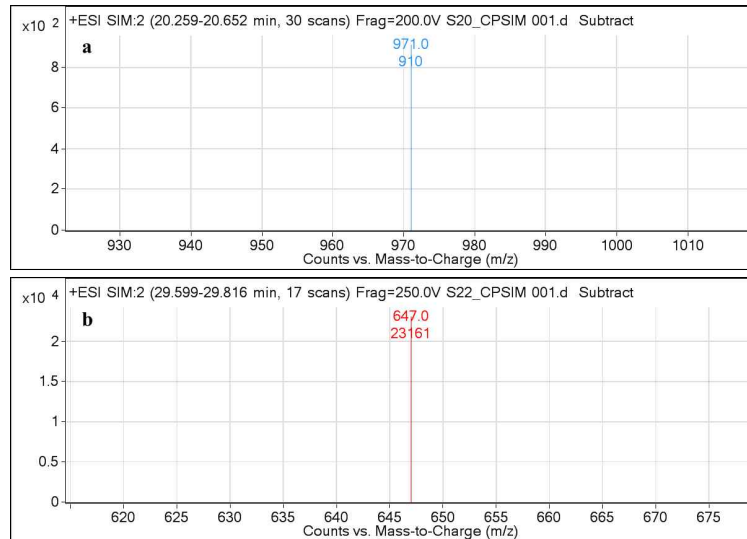
<표> Metal ion에 따른 효소 활성도

Metal ion or reagent (10 mM)	Relative activity (%)
NaCl,	111
KCl	110
CaCO ₃	117
MnSO ₄	100
FeSO ₄	100
MgSO ₄	106
SDS	4
Control	100

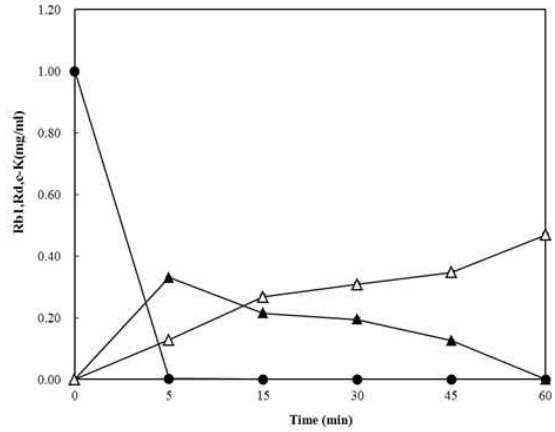
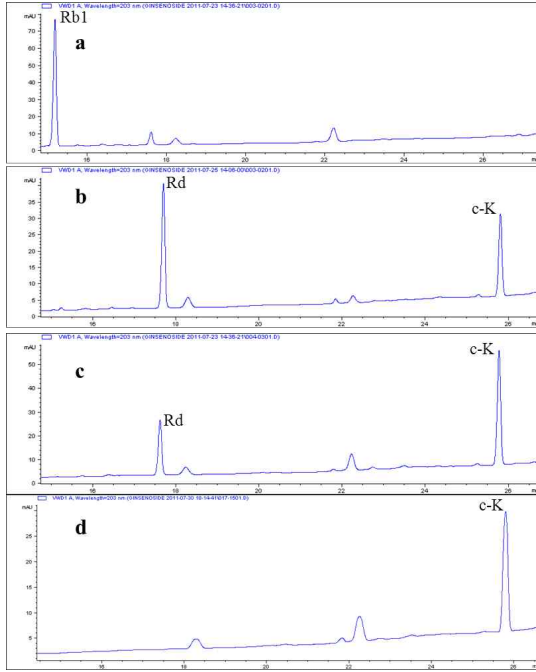


<그림> bgp3 기질 종류별 효소 전환 양상 확인

본 효소를 이용하여 각각 Rb1과 반응 시켜 본 결과, 시간에 따라서 2가지 화합물이 확인되었으며, 반응 1시간 이후에는 모두 C-K로 판단되는 물질로 전환되었으며 이를 LC/MS를 통하여 C-K로 검증하였다.



<그림> bgp3에 의한 C-K 생성 확인



<그림> bgp3 기질 종류별 효소 전환 양상 확인

시험결과 1 mg ml⁻¹ Rb1을 이용하여 반응 한 결과 약 15분 후 0.33 mg ml⁻¹ Rd와 0.139 mg ml⁻¹ compound K로 전환 시켰으며, 30분 후 0.126 mg ml⁻¹ Rd와 0.320 mg ml⁻¹ compound K로 전환됨이 확인되었다. 최종적으로 Rb1 과 Rd는 모두 분해가 완료 되었으며 0.460 mg ml⁻¹ compound K 가 형성되는 것을 확인 할 수 있었다. 즉, Bgp3는 1 mg ml⁻¹의 Rb1을 0.460 mg ml⁻¹ 로 전환 시킬 수 있으며 이는 분자량을 기반으로 한 수율로 계산하였을 때 95% 이상의 전환율을 가지는 것으로 C-K생성에 있어 매우 뛰어난 효소임이 확인 되었다.

다. 개발된 제조 공정의 상업성 분석

① Ginsenoside Rg2 및 C-K의 대량 생산 및 생산성 비교 분석

본 연구에서 개발된 균주 및 효소를 통하여 Rd, Rg2, Rg3, Rh1, C-K 및 새로운 사포닌인 oxo-CK의 minor 사포닌을 대량으로 전환 시킬 수 있는 효소를 개발 하였다. 최근 다양한 연구를 통하여 C-K를 생성하는 방법에 대한 연구가 지속적으로 이루어 지고 있지만 특이적 물질을 각각으로 전환 시킬 수 있는 개별 효소의 개발이나 방법은 개발된 사례가 미비한 실정이다.

특히, 식품 첨가물로 이용하는 상업효소를 이용하였을 때, F2와 C-K의 전환이 가능하지만 효소를 대량으로 사용해야한다는 점에서 비효율적이라 할 수 있다. 더불어 이들 효소의 경우 사포닌 전환 효소로 개발된 효소가 아닌 pectin의 분해 효소로 기질특이적 반응이 아닌 side effect로 볼 수 있는 문제점을 가지고 있기도 하다. 따라서, 인삼 사포닌을 전환시키기 위하여 개발한 본 개발 효소의 가치가 더욱 뛰어날 것으로 판단되어진다.

본 연구에서는 생산된 효소와 기존에 존재하는 상업효소간의 비교분석을 통하여 상업적 타당성을 확인해 보고자 하였다.

<표> 상업효소와 생산 효소의 비교를 통한 경제성 분석

사용 Enzyme 명	Enzyme 사용량	Rb1 (100mg/500ml)	소요 비용
Pectinex (novozyme)	500ml (10,000U)	C-K 19mg	₩25,000
Viscozyme (novozyme)	500ml (10,000U)	F2 20mg	₩25,000
bqp1	50ml (10,000U)	Rg3 45mg	₩5,000
bqp3	50ml (10,000U)	C-K 41mg	₩5,000

기존에 C-K와 F2를 생성한다고 잘 알려진 Pectinex와 viscozyme을 이용하여 인삼의 minor 사포닌을 생성 했을 때와 본 연구를 통하여 생산한 효소를 이용하여 minor 사포닌을 생성 하였을 때의 비교를 위하여, ginsenoside Rb1 100mg을 500ml에 녹인 후, Enzyme을 각각 처리하였을 때, 생성되는 최종 물질의 양과 소요 비용을 확인하여 보았다.

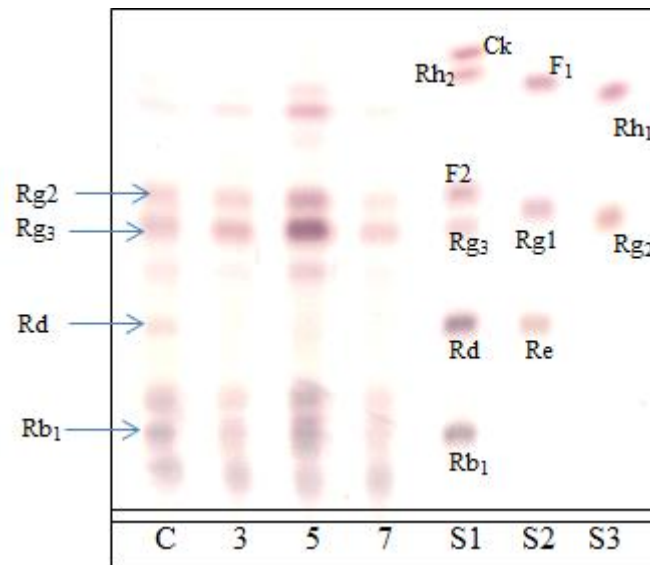
그 결과 pectinex를 이용하여 Rb1을 전환 시킬 경우 약 100mg 으로부터 19mg의 C-K를 생성할 수 있었으며 viscozyme을 이용하였을 때는 20mg의 F2를 생성 시킬 수 있었다. 이때의 enzyme 사용량에 따른 비용은 약 25,000원 수준으로 조사 되었다. **본 연구 개발 효소를 이용할 경우 각각 Rg3 45mg과 C-K 41mg을 생성 할 수 있어, 기존 효소 대비 2배 이상의 효율성을 나타내는 것은 물론 효소의 양을 1/10 수준으로 절대적으로 줄일 수 있어 소요되는 효소 원가가 약 5,000원 수준으로 기존 대비 1/5로 줄어드는 것을 확인 한 바 상업적으로도 매우 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대 되었다.**

5절. 인삼 사포닌 전환 물질의 산업화 개발

1. 기능성 미생물 발효 제품 개발 프로세스 확립

(1) 개발 미생물 효소 Bgp1을 활용한 Rg3 및 Rh1 강화 농축액의 생산

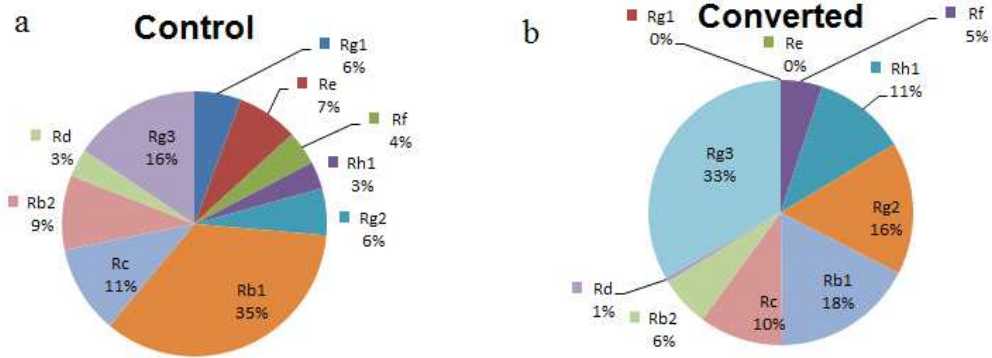
본 연구에서는 개발된 bgp1 효소를 이용하여 Rg3를 대량으로 생산하고 이의 기능성을 검증하고자 하였다. 본 세부과제에서 개발된 효소를 3협동과제와 연계하여 홍삼 농축액으로부터 기능성 물질을 생산하였으며 이를 2세부 과제에서는 이용하여 효능을 확인하였다.



<그림> 홍삼 농축액과 bgp1과의 반응을 통한 사포닌의 전환

TLC를 통하여 확인한 결과로 기존의 홍삼의 농축액에 존재 하였던 ginsenoside Rg3의 양이 효소에 의하여 증가함을 확인 할 수 있었으며, PPT 계열의 Rh1의 양이 증가함을 알 수 있었다. 이는 앞서 확인하였던 단일 물질을 bgp1 효소로 처리했을 때의 결과와 유사한 것으로, 홍삼 농축액의 포함되어진 PPD 계열의 사포닌이 Rg3로 전환되고 Rg1과 같은 PPT 계열의 사포닌의 경우 Rh1으로 전환 되었기 때문으로 판단되어진다. 본 연구팀에서는 bgp1과의 반응을 통해 전환 된 농축액의 사포닌의 전체적인 profile을 분석하고자 하였으며, 이를 통하여 단일 물질 수준 뿐 아니라 농축 및 추출물에도 효과적인 전환 능력을 갖는지 확인하였다.

	Rg1	Re	Rf	Rh1	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg3
Control	1.74705	2.28515	1.2631	1.02002	1.74953	10.58	3.28623	2.78608	1.04376	4.77556
FerRGE	0	0	1.05549	2.39311	3.52969	3.27193	2.18775	0.76212	0.10649	7.85383



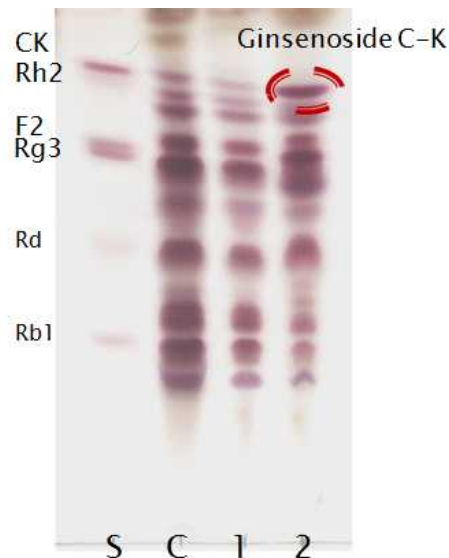
<그림> 홍삼 농축액과 bgl1과의 반응을 통한 사포닌의 분석

분석결과 TLC의 패턴과 같이 존재하는 major 사포닌이 감소하고 minor 사포닌이 증가함을 알 수 있었다. 홍삼 농축액의 대다수를 차지하던 Rb1의 양이 전환을 통하여 급격하게 줄어들었으며, 반대로 Rg3의 양이 기존 대비 2배 이상 증가함을 확인 할 수 있었다. 더불어 Rg2와 Rh1의 양 또한 기존 대비 3배 이상 증가함을 확인한 바 본 효소가 minor 사포닌 생성에 있어서 충분한 역할을 가지고 있음을 재검증할 수 있었다.

2. 한국형 미생물을 활용한 인삼 발효 추출물 개발

(1) *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65를 활용한 C-K 강화 농축액의 생산

본 연구에서는 앞서 분리한 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65 단일 물질 수준에서 뛰어난 사포닌 전환능력을 가져 C-K를 생성 할 수 있는 것을 확인하였다. 따라서, 이를 이용하여 인삼 추출물을 전환 시킬 수 있는지 확인하기 위하여 균주배양시 홍삼농축액을 첨가하여 사포닌 전환이 일어나는지 확인해 보고자 하였다. 홍삼 농축액 5% 수용액을 멸균한 수용액과 균주가 잘 성장할 수 있게 하기 위하여 홍삼 농축액 5% 수용액에 탄소원 소량 첨가하여 일주일 간 발효 시켜 생성 물질을 비교하였다.



<그림> 홍삼 농축액과 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65과의 반응을 통한 사포닌의 전환

C: 홍삼 농축액, 1: 홍삼 농축액5% 수용액, 2: 홍삼 농축액 5% + 탄소원

시험 결과, 위의 그림과 같이 같은 균주를 접종하여 발효를 진행 하였음에도 불구하고 C-K의 생성양상이 다른 것을 확인 할 수 있었다. 이는 단순 5% 홍삼 농축액을 이용하였을 경우에는 균주가 원활히 성장하지 못하고 이로 인하여 사포닌을 전환 시킬 수 있는 균주의 효소가 충분히 생성되지 못하였기 때문으로 사료된다. 홍삼 농축액 5% + 탄소원을 첨가한 처리구의 경우 Rb1과 같은 major 사포닌이 충분히 가수 분해 된 것을 확인 할 수 있으며, F2와 C-K가 다량으로 형성 되는 것을 확인하였다. HPLC를 통하여 C-K와 F2의 함량을 분석하여 본 결과 F2는 기존 0.3mg에서 1.2mg으로 증가함을 확인 하였으며, C-K의 경우 기존의 홍삼 농축액에서 검출되지 않았던 것에 비하여 2.4mg이 형성된 것을 확인할 수 있었다.

<표> 일반홍삼(RG)과 *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65 발효홍삼(FRG)의 사포닌 함량 분석

	RG (발효 전)	FRG (발효 후)
Rg1	0.72 ± 0.01	0.1 ± 0.01
Re	1.18 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Rh1	0.3 ± 0.02	0.66 ± 0.02
Rb1	3.57 ± 0.01	0.82 ± 0.01
Rc	2.96 ± 0.01	0.56 ± 0.01
Rb2	1.6 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Rd	1.27 ± 0.01	0.99 ± 0.01
Rg2	0.11 ± 0.02	0.54 ± 0.02
Rg3	0.64 ± 0.01	1.24 ± 0.01
F2	0.31 ± 0.0	1.44 ± 0.0
Rf	0.63 ± 0.01	0.37 ± 0.01
C-K	ND	2.4 ± 0.01

(2) *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65 이용한 C-K 강화 발효 홍삼 농축액 시제품 제조방법 확립

[연구 목적]

*Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65를 이용하여 compound K가 증강된 발효홍삼제품 시제품 제조

- (가) 추출 조건 확립 : 용매와 온도에 따른 최적 방법 검토
- (나) 여과 조건 확립 : 여과/원심분리/Trap Filter 등 고려
- (다) 농축 조건 확립 : 진공감압건조기를 통한 최적의 농축 조건 확립
- (라) 보관 조건 확립 : 분말/액상 제형의 온도에 따른 보관방법 개발
- (마) 안전성 검사 : 잔류농약검사, 중금속 검사, 미생물 검사
- (바) 유통기한 설정
- (사) 패키징단위 설정 및 디자인 개발
- (아) 공전에 준한 제품 품질검사

(가) 추출 및 발효 조건 확립

본 실험에서는 홍삼의 추출 조건에 따른 홍삼 추출물의 제조공정을 비교하여, 최적 조건을 확립하고자 하였다. 산업 현장에서 사용 되는 추출기를 이용하여 홍삼 추출물의 용매와 온도를 고려하였다. 통상적으로 식약청에서 허용하는 용매는 물과, 주정(알코올)을 추출용매로 허용하고 있다. 물은 사용이 용이한 점이 있지만 식수관리 등의 정도 관리가 필요하고 주정 (알코올)에 비해 추출 수율이 떨어지며, 끓는점이 높기 때문에 가열 추출을 한다면 고비용의 에너지 사용이 요구되는 단점이 있다. 반면에 주정(알코올)의 경우는 초기 구매 비용을 감안하면 물에 비해 추출수율도 매우 우수하며 정도 관리가 용이하다. 또한 추출 후 농축시 회수가 가능해 재사용이 가능해지므로 초기 구매 비용의 부담을 없앨 수 있으며, 물보다 끓는점이 현저하게 낮기 때문에 가열 추출시 저에너지의 비용이 들어가므로 물에 비해 비용 절감이 탁월하게 우수하다. 그러나 발효에 있어서 주정(알코올) 추출물에 있어서 발효미생물의 생육에 영향을 미친다. 그래서 홍삼의 추출조건은 물을 사용, 80~85℃로 최적 조건을 확립하였으며, 균주의 발효시 1세부과제에서 개발한 균주 발효 방법을 활용하였다.

① Bioreactor system을 이용한 생물전환 발효 조건 확립

Bioreactor를 이용한 대량생물전환의 미생물의 발효조건 확립 및 발효생산성 분석은 사포닌 생산의 최적조건을 확립하기 위하여 한방바이오(주)에서 개발한 2L, 18L Bioreactor를 사용하였다.



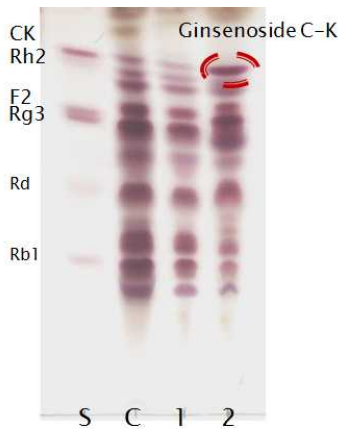
<그림> 개발 미생물의 대량 배양을 위한 Bioreactor system

<배양 조건의 확립>

- ① 대량배양시스템을 위하여 온도를 조절할 수 있는 공간 필요하다.
- ② 실험실 수준의 배양시설이 되게 위해서 8~10평 정도의 배양실을 준비하여야 하며, 균주 효소를 접종할수 있는 5~6평의 접종실, 4평정도의 배지조제 및 오토클레이브 (autoclave, 멸균기)실, 세척 및 준비실(증류수 채취기 등)이 필요하다.
- ③ 배양실은 냉·온풍기를 이용하여 22-25 °C를 유지하였다.

<표> Bioreactor system을 이용한 생물전환 발효 공정도

No.	공정 순서	공정 내용	
1	준비	18L배양통 준비(18개 1세트)	
		정제수를 이용하여 홍삼농축액을 5% 농도로 희석	
2	Autoclave	배양에 이용할 Bioreactor 멸균 (121℃ 15분)	
3	접종	<i>Lactobacillus panaxibrevis</i> DCY65균주를 최종농도 1%로 접종	
4	배양	온도와 습도를 조절할 수 있는 배양실에서 30℃에서 72시간동안 배양	
5	진세노사이드 변환확인	일정 조건에서 배양되어진 배양액을 HPLC 분석을 통하여 진세노사이드 전환여부 및 정량 확인	
6	수확	발효 된 배양액 수확	
7	농축	수확된 배양액을 대형 감압농축기를 이용하여 농축(고형분 60~65%)	
8	정량분석	발효홍삼 농축액 Rg1+Rb1함량 및 희귀진세노사이드 Rh2 / C-K 함량 확인	
9	출하	제품원료로 사용	



	RG (발효 전)	FRG (발효 후)
Rg1	0.72 ± 0.01	0.1 ± 0.01
Re	1.18 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Rh1	0.3 ± 0.02	0.66 ± 0.02
Rb1	3.57 ± 0.01	0.82 ± 0.01
Rc	2.96 ± 0.01	0.56 ± 0.01
Rb2	1.6 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Rd	1.27 ± 0.01	0.99 ± 0.01
Rg2	0.11 ± 0.02	0.54 ± 0.02
Rg3	0.64 ± 0.01	1.24 ± 0.01
F2	0.31 ± 0.0	1.44 ± 0.0
Rf	0.63 ± 0.01	0.37 ± 0.01
C-K	ND	2.4 ± 0.01

<그림> Bioreactor system을 이용한 사포닌 전환 시험

1세부 과제와 연계하여, 발효 최적 조건을 확립하였으며 그결과는 Rb1과 같은 major 사포닌이 충분히 가수 분해 된 것을 확인 할 수 있으며, F2와 C-K가 다량으로 형성 되는 것을 확인하였다. HPLC를 통하여 C-K와 F2의 함량을 분석하여 본 결과 F2는 기존 0.3mg에서 1.2mg으로 증가함을 확인 하였으며, C-K의 경우 기존의 홍삼 농축액에서 검출되지 않았던 것에 비하여 2.4mg이 형성된 것을 확인할 수 있었다.

<표> 발효 홍삼 추출물의 온도 및 시간 조건 별 수율 측정

온도 \ 시간	4시간	6시간	8시간	10시간
60~65℃	50%	54%	60%	60%
70~75℃	54%	60%	63%	63%
80~85℃	57%	62%	65%	65%
90~95℃	60%	63%	65%	65%

(나) 여과 조건 확립

발효홍삼추출물의 여과 조건 확립에 있어 여과, 원심분리, Trap filter 등을 조사하고 현 국내 공장에서 사용하는 여과 제조조건에 적용에 본 결과 현재 추출공장에서 널리 사용하고 있는 원통형 하우징방식의 여과를 이용하여 여과를 실시하였다. 사용하는 필터는 1차 메쉬망 필터로 100 메쉬, 2차 부터는 micro filter로 100~150 micro 그리고 최종적으로 25 micro 이하로 사용하는 여과조건을 확립하였다.

(다) 농축 조건 확립

발효홍삼추출물의 농축조건은 현 제조공장에서 사용되고 있는 농축방식에 적용하여 생산한 결과 양호한 것으로 나와 진공 환류냉각방식으로 추출액을 용기에 넣고 일정한 온도와 압력(농축온도 : 60℃이하, 감압 : 800~950mm/Hg)을 유지시켜 증발하는 증기를 환류 냉각장치로 유입시켜 냉각수에 의해 증기를 응축시켜 외부로 배출되고 추출물만 남게 되는 방식으로 확립하였다.

(라) 보관 조건 확립

식품의 보관이란 그 품질이 오랫동안 변지 않도록 유지 시키는 것을 말한다. 여기서 품질이란 성분상 품질과 기호성 품질 모두를 말한다. 그러므로 유효성 부분과 미생물 생육조건 등을 고려하여 보관 방법을 식품공전, 건강기능식품공전, 그리고 현재 사용되고 있는 원료 및 제품 포장 등을 고려하여 설정하였다. 분말의 보관방법은 수분 함량이 8% 이하이므로 (평균 3% 이하) 직사광선이 침투하지 못하는 포장에 온도는 상온(15~25℃) 보관이 비용부분까지 고려해서 최적이며 액상제형은 원료는 벌크타입을 포장하는 포장이 밀봉 부분에서 아직 완전하지 못하여 냉장(0~5℃, 식품기준은 10℃ 기준)보관이 최적이며 제품화 하였을 시에는 제품의 제조공정과 밀봉포장을 고려하여 상온 보관한다.

(마) 안전성 검사 : 잔류농약검사, 중금속 검사, 미생물 검사

발효홍삼농축액의 농약잔류성을 조사하기 위해서 식품공전(2014)의 시험법에 따라서 34종에 대한 농약잔류시험 분석을 한 결과 시험항목 등을 전혀 검출이 되지 않았다

<표> 발효홍삼농축액의 농약잔류시험

시험항목	기준규격	결과	판정
DDT(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Metalaxyl(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Aldrin&Dieldrin	0.1 and less	Not detected	Pass
BHC(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Endrin(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Carbendazim(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Quintozene(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Difenoconazole(ppm)	0.5 and less	Not detected	Pass
Cypermethrin(ppm)	0.3 and less	Not detected	Pass
Azoxystrobin(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Tolyfluanid(ppm)	0.01 and less	Not detected	Pass

Tolclofos-methyl(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Iminoctadine(ppm)	0.5 and less	Not detected	Pass
Pyrimethanil(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Fenhexamid(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Cyazofamid(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Cyprodinil(ppm)	5.0 and less	Not detected	Pass
Kresoxim-methyl(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Diethofencarb(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Carbosulfan(ppm)	0.3 and less	Not detected	Pass
Trifloxystrobin(ppm)	0.2 and less	Not detected	Pass
Pencycuron(ppm)	0.7 and less	Not detected	Pass
Ethylenebis(dithiocarbamate)s(ppm)	0.3 and less	Not detected	Pass
Fludioxonil(ppm)	3.0 and less	Not detected	Pass
Cyfluthrin(ppm)	0.3 and less	Not detected	Pass
Chloothalonil(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Tefluthrin(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass
Fluquinconazole(ppm)	0.2 and less	Not detected	Pass
Cymoxyanil(ppm)	0.2 and less	Not detected	Pass
Tebupirimfos(ppm)	0.01 and less	Not detected	Pass
Flutolanil(ppm)	1.0 and less	Not detected	Pass
Thifluzamide(ppm)	2.0 and less	Not detected	Pass
Dimethomorph(ppm)	0.2 and less	Not detected	Pass
Cadusafos(ppm)	0.1 and less	Not detected	Pass

식품공전(2014)의 시험법에 따라서 홍삼으로부터 추출하여 농축한 발효홍삼농축액의 금속 함유여부를 조사하기 위해서 4종의 납(Pb), 비소(As), 카드뮴(Cd), 수은(Hg)의 잔류성을 분석하였다. 그 결과 위 4가지 중금속은 발효홍삼농축액에서는 기준치 이상으로 검출이 되지 않았다.

<표> 발효홍삼농축액의 중금속 성분분석

시험 항목	시험기준	시험결과
납(Pb)	1.0 mg/kg 이하	불검출
비소(As)	1.0 mg/kg 이하	불검출
카드뮴(Cd)	1.0 mg/kg 이하	불검출
수은(Hg)	1.0 mg/kg 이하	불검출

<표> 발효홍삼농축액 미생물 검사

시험 항목	시험기준	시험결과	판정
대장균군	음성이어야 한다	음성	적합
세균수	3000 cfu/ml 이하	0/ml	적합

발효홍삼농축액의 안전성 조사를 위해서 그람 음성 세균인 대장균군과 일반세균을 조사하였다(식품공전 2014). 발효홍삼농축액을 멸균증류수에 처리한 후 각 단계 희석액 1 ml를 접종한 대장균군 건조필름배지에 접종한 후 잘 흡수시키고, 36±1℃ incubator에서 24시간 배양하였다. 필름에 생성된 붉은 집락 중 주위에 기포를 형성하고 있는 집락수를 조사한 결과 발효홍삼농축액에서는 전혀 대장균군 및 세균군이 검출되지 않았다. 이를 바탕으로 시제품 생산을 위한 제조공정서를 작성하였으며 제조공정서 내용은 아래와 같으며 농축액 시제품은 아래의 사진과 같다.

<표> 발효 농축액 제조 공정서

원료선별 및 칭량	1.원료의 이물 등을 선별한다. 2.원료확인 후 비율에 맞게 칭량한다.	*검사성적서, 원산지 증명서, 경작확인서 확인
추 출	1.칭량한 원료를 추출기에 넣고 물을 일정 비율 투입한 후 75~80℃의 온도에서 8시간 추출한다.(4회 반복 추출)	*추출기 *주정계
여 과	1.추출액을 백필터와 카트리지 여과필터를 이용하여 여과한다.	*하우징
농 축	1.추출한 액을 감압농축한다.(60℃이하, 800~950mmHg)	*농축기
살 균	1.농축한 홍삼농축액을 80~90℃에서 1시간 정도 살균한다.	
발 효	1.홍삼농축액을 일정 Brix까지 낮춘 후 효소 및 발효균을 투입하여 발효시킨다.	*발효조
멸 균	1.발효가 완료된 액을 온도 95~100℃에서 1시간 멸균한다.	
농 축	1.멸균한 액을 일정 Brix 까지 농축한다.(60~65Brix)	*농축기
충 전	1.일정 용기(PE, 유리병)에 자동 충전한다.	*전자저울

포 장	1. 충전한 발효홍삼농축액을 포장한다.	
검 사	1. 건강기능식품공전에 준하여 자가품질검사를 실시한다. (검사항목:성상, 진세노사이드Rb1+Rg1합, 대장균균, 세균수)	
출 하	1. 자가품질검사에 적합한 제품에 한하여 출하한다.	

	
발효홍삼농축액	100g×2병(목함)

< 공전에 준한 제품 품질검사 >

발효홍삼농축액제품은 성상이 갈색의 액상제품으로서 이미, 이취가 없어야하고 건강기능식품으로서 인정을 받기 위해서는 일정수준이상의 사포닌(ginsenoside Rg1과 Rb1, Rg3의 합(2.4 ~ 34 mg/g)이 함유되어 있어야 한다. 또한 대장균균은 음성이여야 하며, 세균수는 3000cfu/ml 이하이어야 한다. 발효홍삼농축액제품의 기준규격 시험을 분석한 결과 모두 만족하는 결과를 얻을 수 있었다.

<표> 발효홍삼농축액 제품의 기준규격시험분석

시험 항목	시험기준	시험결과	판정
성상	고유의 색택과 양미를 가지며 이미·이취가 없어야 함	흑갈색의 점조성 액상제품으 로 이미·이취가 없음	적합
Rg1과 Rb1, Rg3의 합	표시량(4 mg/g)의 80%이상	4.4 mg/g	적합
대장균군	음성	음성	적합
세균수	3000 cfu/ml 이하	0/ml	적합

(3) 한국형 유산균의 발효를 통한 발효홍삼 제조 최적화 공정 확립 및 시제품 개발

한국형 유산균 및 발효방법을 생성이 이미 시장 수요가 높은 ginsenoside C-K를 과제를 통해 우선 생산하고 이를 최적화 하였다.

가. 홍삼건강기능성제품 제조를 위한 formula 개발

한국형 미생물 발효에 의하여 전환된 CK를 고함유하고 있는 발효 홍삼 및 홍미삼 추출물 숙성농축액, 홍삼동체추출물을 주성분으로 하고 여기에 아가리쿠스, 건강, 대추, 황기, 당귀 등의 약제 추출물과 타우린, 식이섬유 및 4가지 비타민을 첨가한 건강기능성식품용 시제품을 개발하였다. 당류는 열량이 적은 기능성 당류인 말티톨과 아세설팜-칼륨을 사용하였다.

Table. Formula for health functional product of red ginseng with high concentration of ginsenoside CK.

Component	Content(mg/EA)
6 years Red ginseng extract	1,500
Red ginseng/Plum mature extract	1,280
Red ginseng Root extract	500
Agaricus extract	800
Ginger extract(solid 60%)	30
Jujube extract(solid 60%)	770
Astragali Radix extract(solid 60%)	450
Angelicae Gigantis Radix extract(solid 60%)	750
Taurine	300
Fiber	500
Vitamin B1	0.7
Vitamin B2	0.8
Nicotinic acid amide	8
Vitamin B6	1
Guar gum	30
D-Maltitol	8,000
Acesulfame Potassium	13



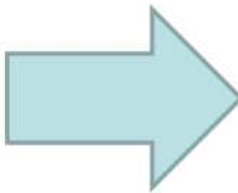
시제품 개발 제형

제품명	제형	규격
발효홍삼정환	환	3.75g*30
발효홍삼농축액	농축액	240g
발효홍삼농축분말	농축분말	30g*2병
발효홍삼음료	액상	100ml
발효홍삼캡슐	캡슐	500mg

발효홍삼제품은 발효의 기준점과 성분변화에 따른 Ending Point가 형성되어있지 않는 상태에서 농축액 제조

단순히 공정내에 발효공정을 추가하여 미생물 또는 효소를 이용한 발효과정을 거친 것을 발효농축액으로 사용

현재 유통중인 발효홍삼제품



발효 공정을 통하여 특정성분(C-K, Rh2)으로 전환

전환된 특정성분 함량의 기준을 설정하여 발효가 완료되었다는 발효 완료점을 설정

특정성분의 기준함량이 함유된 발효농축액을 사용하여 기능성 홍삼제품을 개발

개선제품개발

나. 시제품의 생산 및 안전성 검사

시제품의 유통기간과 안전성 검사를 위해서 37℃ incubator에 보관하면서 호기성 세균수 측정용과 대장균군 측정용 film(3M, USA)을 이용하여 3개월간 균수생장을 조사하였다. 그 결과 제품의 3개월간의 처리 후에도 맛과 향, 색상, 산도 등의 변화는 없었으며, 균증식도 관찰되지 않아 안정성과 안전성에는 전혀 문제가 없었다(Table, Table).

Table . Physiochemical stability of a prototype

Distribution	Basis	36℃ incubation		
		One month later	Two months later	Three months later
Taste	·	○	○	○
Fragrance	·	○	○	○
Color	·	○	○	○
pH	·	4.51	4.51	4.52

* ○ : Excellent, △ : Good, × : Imbalance.

Table . Microorganism analysis for expiry date setting of a prototype

Distribution	Basis	36℃ incubation		
		One month later	Two months later	Three months later
Coliform Group	negative	negative	negative	negative
Standard plate count (cfu/ml)	100 and less	ND	ND	ND

*ND : Not detected.

2. 미생물에 의한 인삼 발효 물질의 기능성 검정

(1) *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65 및 bgp1를 활용한 C-K 강화 농축액의 효능효과

① 세포 배양

MC3T3-E1 세포(CRL-2953, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA)는 증식유도 배지[growth medium, GM; α -minimal essential medium (α -MEM; LM 00853, WelGENE, Daegu, Korea), 10% fetal bovine serum(FBS; S001-01; WelGENE)과 penicillin/streptomycin 100 unit/ml, 100mg/ml (LS202-02, WelGENE)]에서 배양하였다. 세포 분화를 유도하기 위하여, confluent 상태로 배양된 세포를 분화유도 배지[*differentiation medium*, DM; α -minimal essential medium(α -MEM, LM 00801; WelGENE), 10% FBS, penicillin/streptomycin 100 unit/ml, 100 mg/ml, ascorbic acid 50 mg/ml (Sigma Co, St Louis, MO, USA), 10mM β -glycerophosphoric acid disodium salt(5mmol/L; Sigma Co)]에서 배양하였으며, 약물의 분화 효과를 검정하기 위해 세포에 전환 전 후의 홍삼 농축액분말화 하여 각각 처리하였다.

② 조골세포 증식을 측정 및 ALP 효소 활성 측정

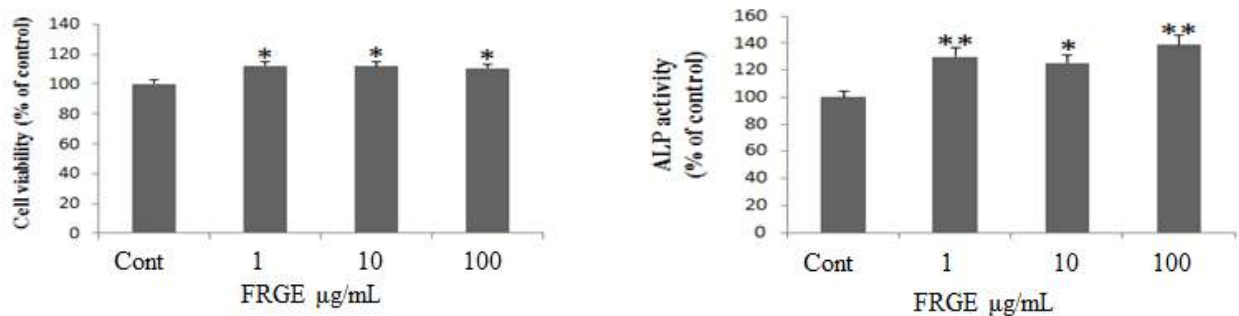
<세포 증식을 측정>

분말화 전환 홍삼 농축물의 농도 별 처리에 따른 조골세포의 성장 속도는 MTT colorimetric assay 를 이용하여 측정하였다. well plate에 50,000 cell/cm²의 농도로 조정하여 분주한 후, DMSO에 용해된 각 시료를 최종농도 0, 1, 10, 100ug/ml 로 처리하여 3일 동안 배양하였다. MTT 시약(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, M2128, Sigma Co)을 각 well에 20 mL(5 mg/mL in PBS)씩 첨가한 후 4시간 더 배양하였다. 그 결과 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시키기 위하여 배지를 제거하고 DMSO를 100 mL 첨가하여 실온에서 20분 동안 흔든 후, ELISA reader(Bio Rad iMark Microplate Reader; Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다

< ALP 효소활성 측정 및 콜라겐 생성량 측정>

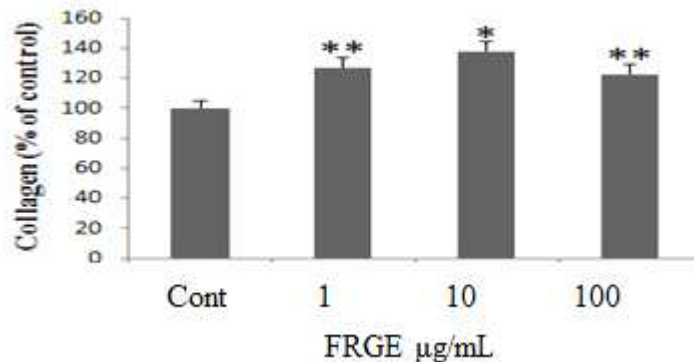
분말화 전환 홍삼 농축물의 농도 별 처리에 따른 조골세포의 성장 속도는 MTT colorimetric assay 를 이용하여 측정하였다. well plate에 50,000 cell/cm²의 농도로 조정하여 분주한 후, DMSO에 용해된 각 시료를 최종농도 0, 1, 10, 100ug/ml 로 처리하여 7일 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 배양액을 제거한 후 Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris, pH 7.4, 150

mM NaCl)용액으로 3회 세척한 후, 각 well에 100 mL의 lysis용액(10 mM Tris, pH 7.4, 0.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100)을 가하고, 세포를 scraper로 수집한 후 초음파 분산기(Fisher Dismembrator; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)를 이용하여 40% 강도로 음파처리 하였다. 그 후, 세포를 4° C 12,000xg 에서 10분간 원심분리 하였으며, 96 Well plate에 상층액을 20 mL씩 각각 분주한 후, 100 mL 의 working assay solution을 넣고 37° C 에서 15분간 반응시켰다. 반응 후 NaOH 용액(200 mM)을 80 mL씩 넣고 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 동일한 cell에 물질을 농도 별로 처리 한 후 14일 배양 세포로부터 Sirius Red-based colorimetric assay 방법을 활용해 콜라겐 양을 측정하여 확인하였다..



<그림> 전환 홍삼 농축액 처리가 세포 활성화도 및 ALP 활성화에 미치는 영향

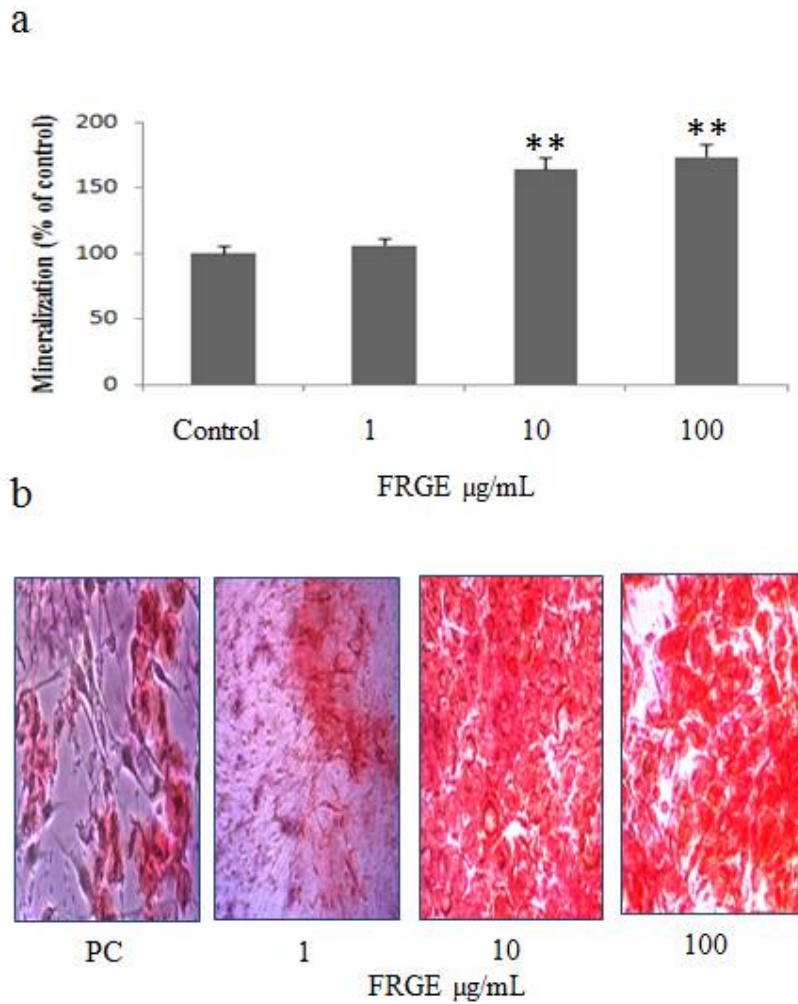
조골세포주의 증식은 전환 홍삼 농축 분말을 농도 별로 처리하였을 때, 대조군에 비하여 증식률이 유의하게 높아 지는 것을 확인할 수 있었으며 ALP 활성화 또한 물질의 처리시 유의적으로 증가함이 확인되었다. 더불어 물질 처리에 따라 조골세포 내의 콜라겐 양이 증대 되는 것을 확인 한 바, bpg1에 의해 전환된 홍삼 농축액이 골다공증에 효과가 있을 수 있는 것을 확인하였다.



<그림> 전환 홍삼 농축액 처리가 조골세포의 콜라겐 생성에 미치는 영향

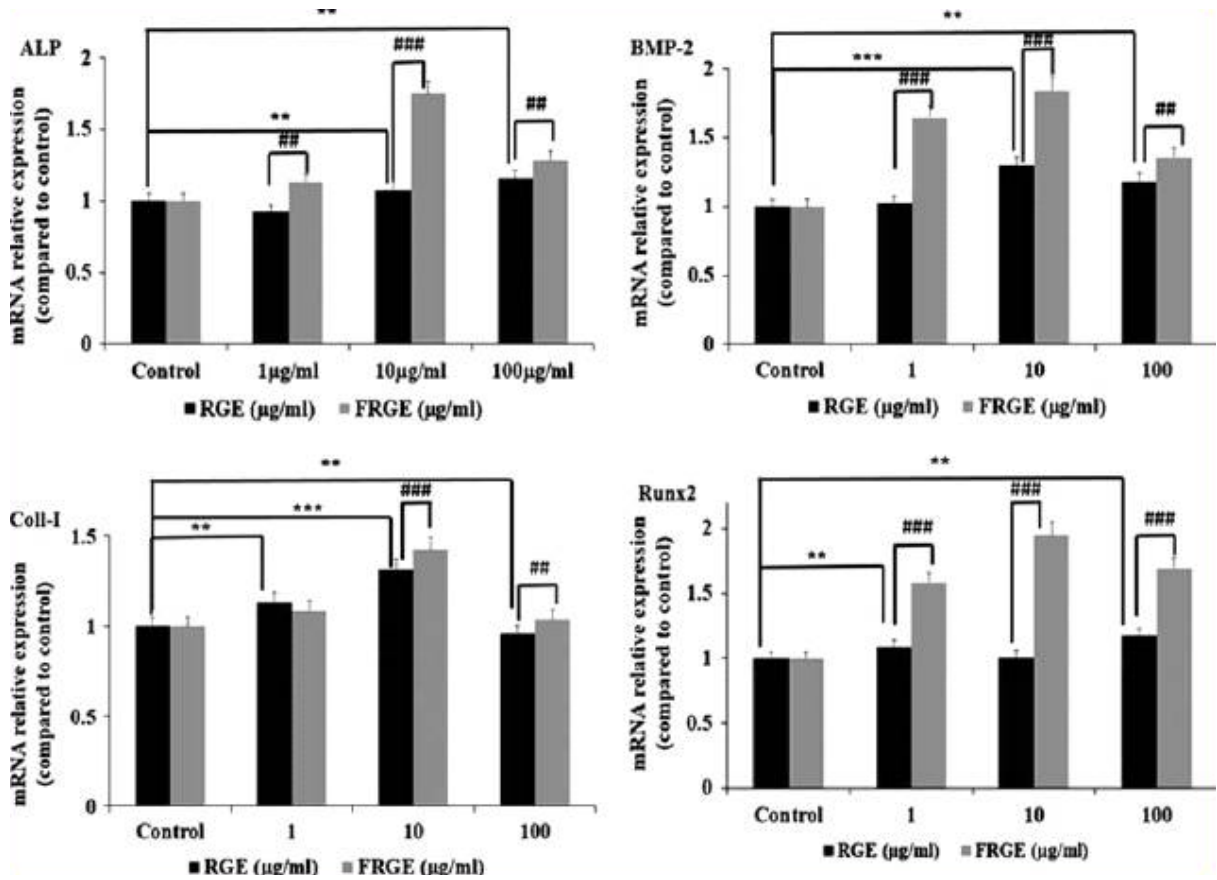
③ Alizarin-red 염색법에 의한 석회화 형성도 검사

MC3T3-E1 세포주를 50,000 cell/cm² 농도로 96well plate에 분주하여 4~5일간 배양한 다음, GM, DM배지 에서 DMSO 및 0.1, 10, 100 ug/ml 농도의 OA, OAA, OAM 을 처리하여 14일간 배양하였다. 그 후 PBS로 2번 세척한 뒤 Alizarin red solution (40 mM, pH 4.2)을 처리하여 실온에서 1시간 동안 고정시킨 후, 현미경으로 관찰하였다.



시험 결과, 다음과 같이 물질 처리에 따라 농도 의존적으로 석회화가 이루어짐을 확인 할 수 있었다. 특히, 처리 전 10ug/ml 처리 농도에서 처리 전 대비 150% 이상의 효과를 보이는 바, 뛰어난 골다공증 억제 효과를 확인할 수 있었다.

④ RT-PCR를 이용한 유전자 발현 분석



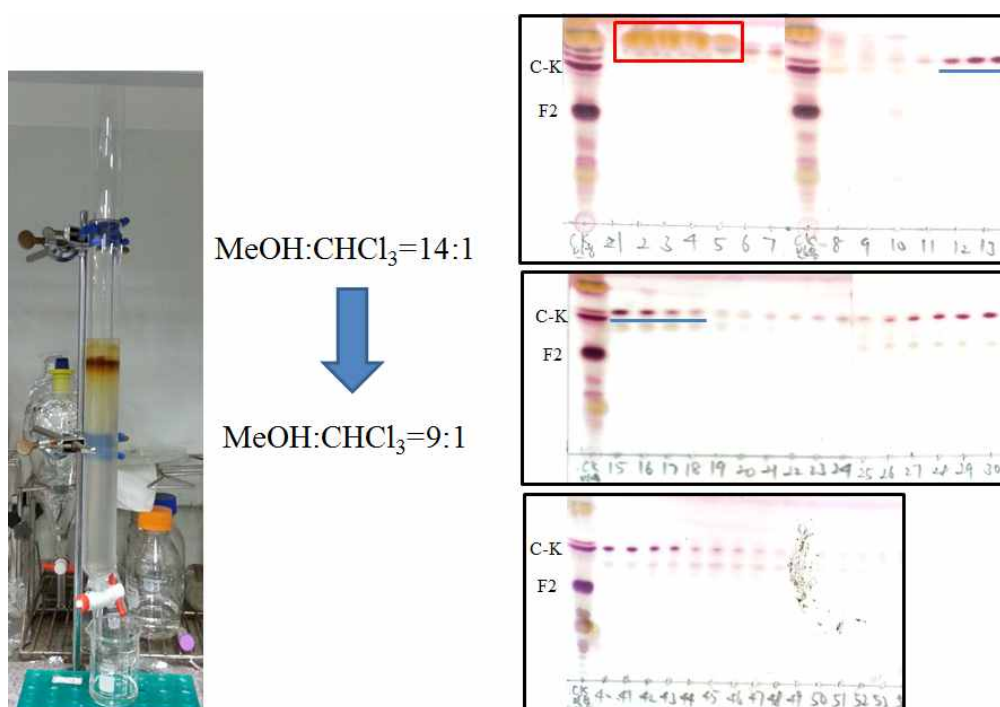
골형성은 여러 단계의 분자생물학적 과정에 의하여 이루어지며, 골 관련 유전자들의 발현에 의하여 조절된다. 골형성 과정의 초기에 교원질이 침착되어 세포외 기질을 형성한 후, 비교적 단백질을 침착시키고 수산화인회석으로 석회화가 일어나게 되는데, 이 과정에서 전환된 홍삼을 처리하게 되면 기존대비 발현 양상을 확인 할 수 있어 골 형성이 촉진 시킬 수 있을 것으로 사료된다.

(2) *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65로부터 생산된 신규 사포닌의 생성 및 효능확인

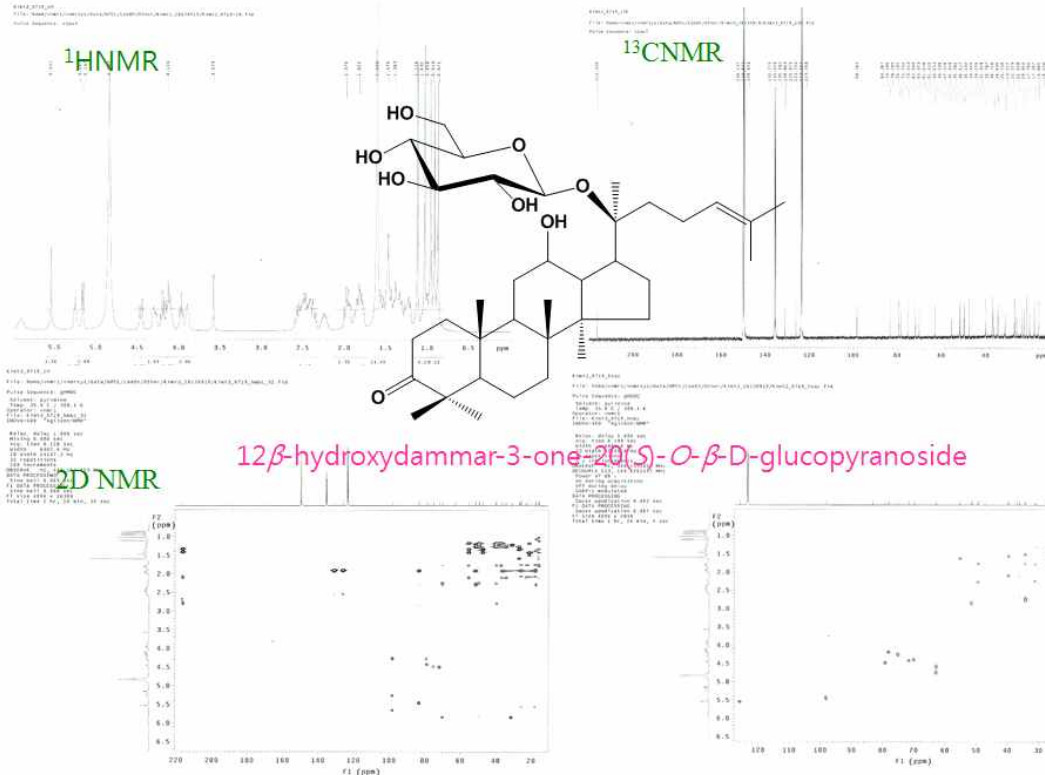
Lactobacillus panaxibrevis DCY65 균주와 발효 조건을 활용하여, 생산된 신규 사포닌의 분리 및 이의 기능성을 검정하기 위한 연구를 수행하였다.

<전환 신규 물질의 분리>

1세부로부터 전달받은 전환물을 10 g에 대하여 silica gel column chromatography (c.c.) (CHCl_3 -MeOH = 14:1 \rightarrow 9:1 \rightarrow 100% MeOH)를 실시하여, 새로운 ginsenoside를 분리하였다.



<그림> *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65 전환 신규 물질의 분리



<그림> 전환 물질의 NMR 구조 동정

구조 동정 결과 본 화합물은 C-K위치의 C-3의 수산기가 ketone화 된 3-oxo-CK로 구조 동정 되었으며, 기존에 잘 알려지지 않은 특수 화합물임을 확인하였다. 따라서, 본 과제에서는 본 화합물의 활용성을 증대 시키기 위하여, 기능성 검정 시험을 진행하고자 하였다.

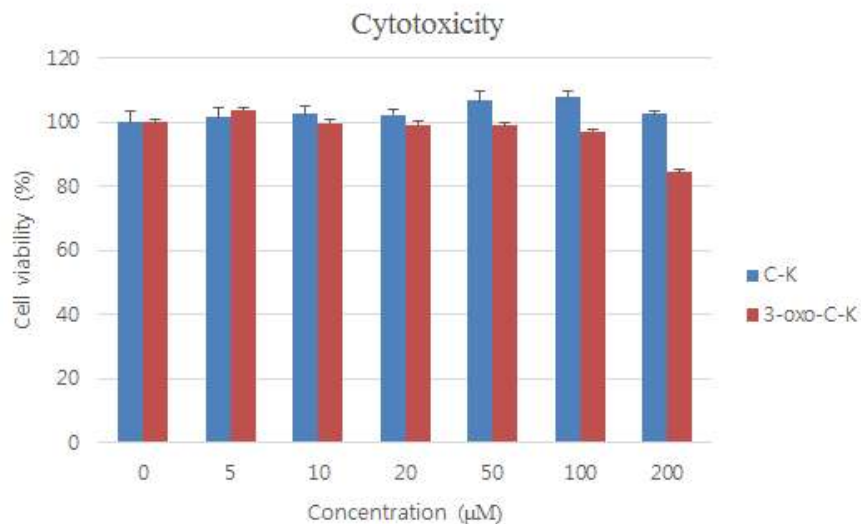
<신규 화합물의 항염증 활성 검정>

① RAW264.7 세포배양

RAW264.7 마우스 대식세포주를 FBS (10%), penicillin (100 U/mL)와 streptomycin sulfate (100 μ g/mL)가 함유된 RPMI 1640배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

② 세포 독성 시험

3-oxo-CK에 대한 세포독성을 알아보기 위하여, WST assay 방법을 실시하였다. RAW264.7을 96well plate에 1.5 x 10⁴ cell/well 씩 동일하게 계수하여 분주한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 5%의 이산화탄소 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 이후, 물질을 농도로 희석하여, 각 농도별씩 40 μ l를 취하여 DMEM 배지와 혼합한 뒤, 각 well에 농도별로 처리하였다. 이를 다시 37 $^{\circ}$ C에서 5%의 이산화탄소 조건으로 CO₂ incubator에 넣어 24시간 배양하였다. 그 후 well당 10% WST(high sensitive Water Soluble Tetrazolium salt)를 100 μ l씩 첨가하고 동일한 조건에서 2시간 동안 반응 시켜주었다. 2시간 뒤, ELISA reader(Thermo, Multiskan EX)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

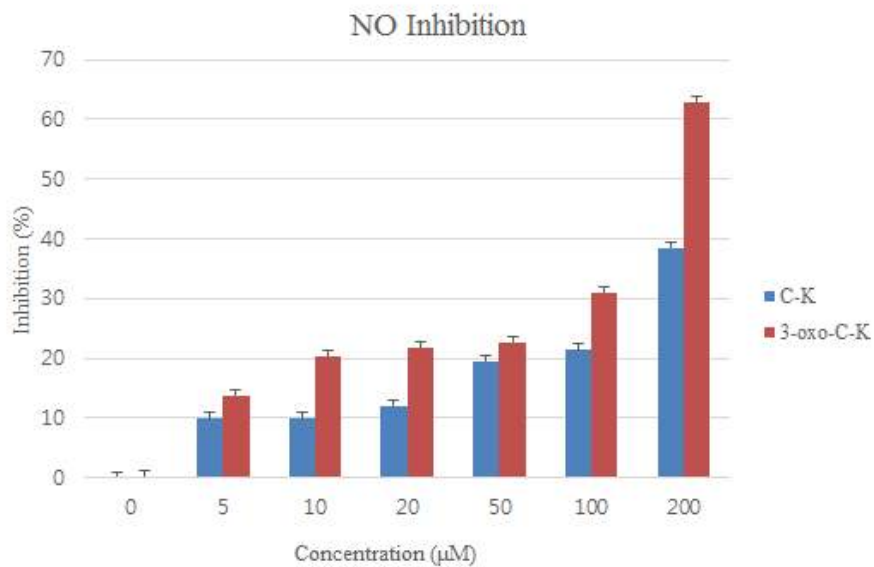


<그림> C-K 및 3-oxo-CK의 세포독성 평가

시험 결과, 위의 그림과 같이 높은 농도에서도 세포 독성이 관찰되지 않아 안전한 원료로 활용할 수 있을 것으로 판단 되었다.

③ NO 생성능 억제 시험

Nitrite assay는 NO생성 양을 측정하는 방법으로 다음과 같이 측정하였다. 배양된 세포를 4×10^5 cells/well 수준으로 24 well plate에 1 mL씩 배양한 다음 24시간 동안 배양하고, 24시간 후 medium 을 제거한 후 RPMI 1640으로 희석된 각 농도별 시료 처리 후 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 처리하여 24시간 후 세포에서 medium으로 분비되어 나온 NO의 양을 Griess 시약 [0.1% (w/v)N-(1-naphthyl)-ethylenediamine and 1% (w/v) sulfanilamide in 5%(v/v) phosphoric acid]을 사용하여 반응하였다. 반응 후 ELISA micro plate reader(Bio Rad Laboratories Inc., USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다. 생성된 NO 양은 Na_2NO_2 를 표준물질로 비교하였다. NO 생성억제 효과는 분리된 추출물을 농도별로 처리 후 LPS를 처리하여 측정된 실험군의 흡광도 값에서 LPS를 처리하지 않은 대조군과의 흡광도 값의 차이를 구하여 계산하였다.

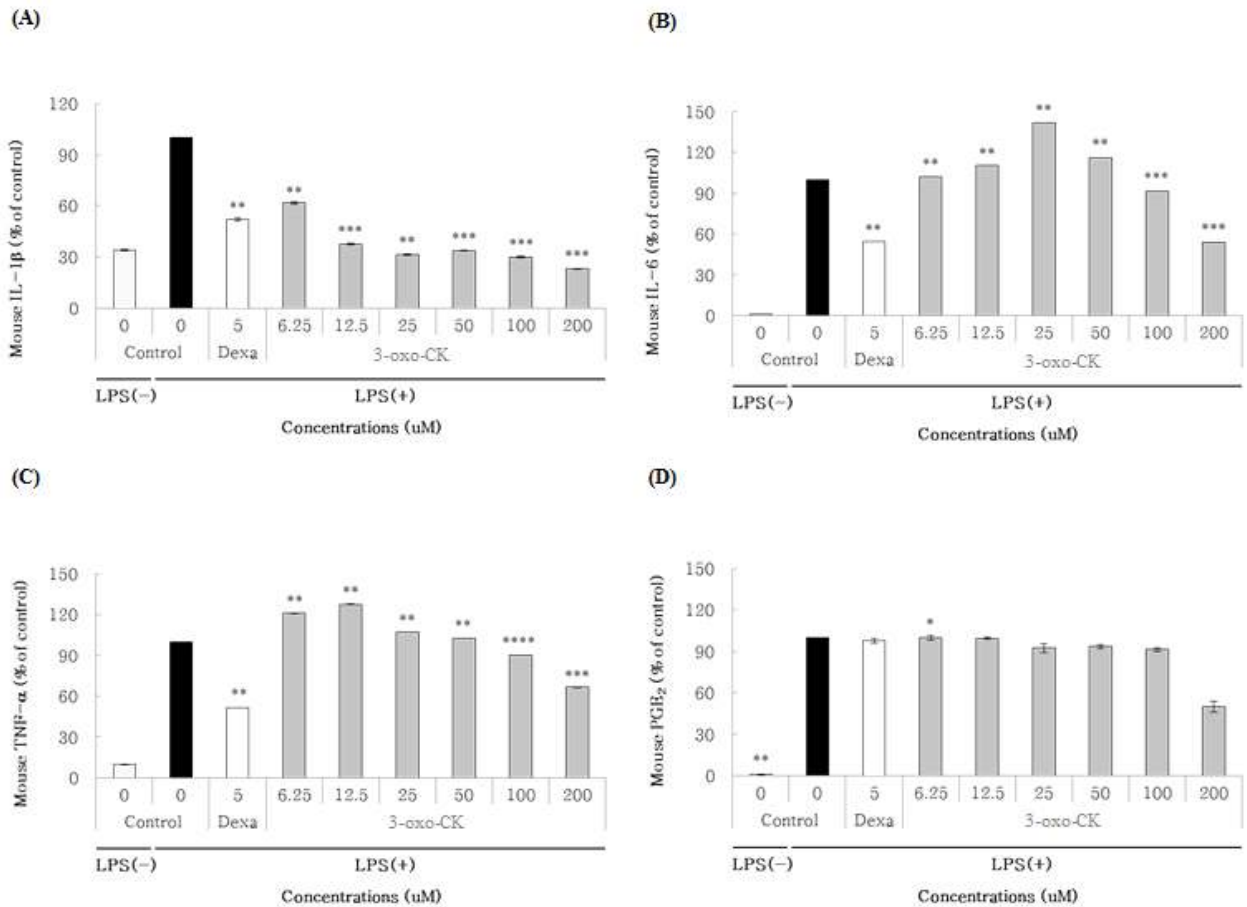


<그림> C-K 및 3-oxo-CK의 NO 억제 효과

시험 결과, 위의 그림과 같이 동일 농도에서 기존의 알려진 효능 물질인 C-K 보다 NO 생성 억제 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이에 본 물질이 높은 항염 활성을 가지는 소재로 활용가치가 있을 것으로 판단하여, 염증억제에 대한 심화 연구를 수행 하고자 하였다..

④ 사이토카인 분비 분석

3-oxo-CK를 LPS와 함께 마우스 면역세포에 처리하고 24시간 경과 후 대표적 염증 증성 사이토카인 3종 (IL-1 β , IL-6, TNF- α)를 면역세포의 배지를 회수하여 ELISA 방법으로 분석하였다



ELISA 방법 세포 외부로 분비되는 염증성 사이토카인에 미치는 영향을 분석한 결과 사이토카인을 효과적으로 저해함을 확인하였다.

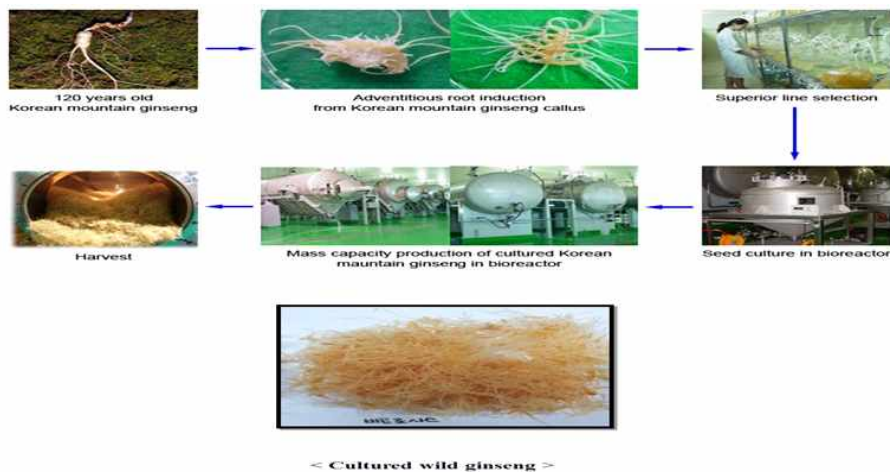
6절 한국형 미생물을 활용한 인삼/산삼배양근 발효음료 개발

1. PPT 타입의 진세노사이드를 증폭시키는 엘리시테이션 조직배양방법 개발

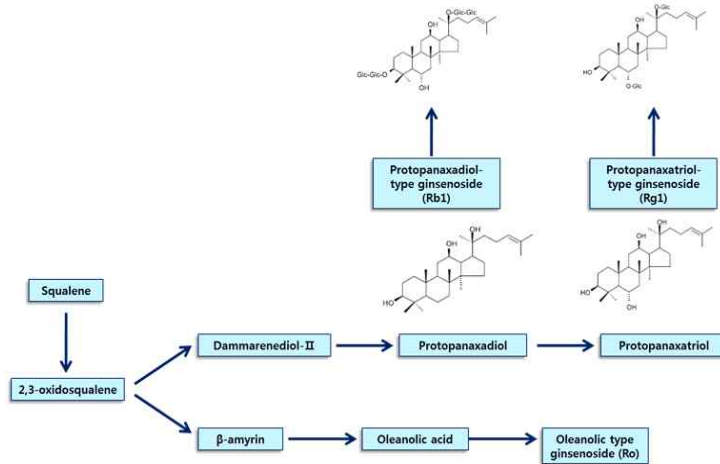
가. 개요

산삼배양근 조직배양 중 사포닌 내 진세노사이드를 증폭시키기 위한 과정(엘리시테이션, elicitation) 중 엘리시터(elicitor)로써 기존 시장에서 사용중인 메틸자스모닉산(MJ)과 베타글루칸, 키토산을 통하여 진세노사이드 중 PPT계열의 함량을 증폭시킬 수 있는 천연소재를 개발하고자 함.

- 기존 산삼배양근 조직배양업체나 학계에서는 조직배양 시 엘리시터(elicitor)로써 메틸자스모닉산(MJ)을 사용하여 기존 진세노사이드의 함량을 올리고 있음.
- 진세노사이드는 2차 대사산물이기 때문에 식물 조직배양 중 배양 시 가혹 조건을 형성할 수 있게 엘리시터를 첨가하여 진세노사이드 함량을 증가시킴. 그러나 엘리시터 첨가 시 배양 가혹 조건이기 때문에 전체 수확할 수 있는 조직배양 수확량(수율)이 떨어지는 단점이 있음.
- 그러나 메틸자스모닉산(MJ)의 경우, PPD 계열의 진세노사이드를 대량 증폭할 수 있으나 PPT계열의 진세노사이드의 함량은 크게 증폭시키지 못하고 있음.
- 현재 특허상이나 학계에서도 전체 진세노사이드의 함량을 증폭시키는 것에는 특이적인 초점을 두고 있으며 PPT 계열을 증폭시킬 수 있는 엘리시터는 아직 보고되지 않았음.
- 또한 현재 사용 중인 엘리시터는 식품첨가물로 사용할 수 없는 화학합성품이 대부분이기 때문에 천연물 유래의 엘리시터의 개발을 필요로 함.
- 특히, PPT 계열의 진세노사이드는 정신적 스트레스 및 피로회복에 도움을 주는 기능이 PPD계열의 진세노사이드보다 뛰어나기 때문에 PPT 계열의 진세노사이드를 증폭시킬 수 있는 엘리시터도 필요함.



<그림> 산삼배양근 조직배양 생산 프로세스



<그림> 인삼 내 진세노사이드 생합성 경로

나. 실험 방법

- 배지: 산삼배양근 배지 + IBA 5mg/L, pH 5.8
- Seed preparation: 클린벤치 내에서 blade를 이용한 cutting
- 접종 방법: 3L 배지가 들어 있는 5L 생물반응기에 seed 15g seed 접종
- Elicitor: MJ, β -glucan, Chitosan
- 배양환경: 20°C에서 암배양
- 조직배양 실험 방법
 - 배지는 121°C에서 20분간 살균하여 준비
 - 산삼배양근 seed를 클린벤치내에서 갈변된 부위를 제거, 10mm 정도의 길이로 절단
 - 3L 배지가 들어 있는 5L 생물반응기에 준비된 산삼배양근 seed 15g을 접종
 - 20°C에서 암상태로 배양. 배양 중에 계속적으로 필터를 통하여 멸균된 air 공급
 - 배양 36일 후 elicitor를 종류별로 처리
- elicitor 준비: 각각의 elicitor를 95% Et-OH에 녹여 처리
- MJ의 경우, 주사기를 이용하여 air를 주입하는 실리콘 튜브를 통하여 주입
 - Control 1(negative control) - 무처리
 - Control 2(positive control) - MJ 50uM(11.22mg/L)
 - Treatment 1 - β -glucan 0.25 mg/L
 - Treatment 1 - β -glucan 0.5 mg/L
 - Treatment 2 - β -glucan 11.22 mg/L
 - Treatment 3 - Chitosan 0.25 mg/L
 - Treatment 3 - Chitosan 0.5 mg/L
 - Treatment 4 - Chitosan 11.22 mg/L
- β -glucan은 불용성이어서 Et-OH와 혼합한 후 클린벤치 내에서 open 한 후 처리
- Chitosan의 경우 Et-OH에 녹기는 하였으나 점성이 너무 높아 주사기를 이용할 수 없어서 β -glucan과 마찬가지로 클린벤치 내에서 반응기를 open 한 후 처리

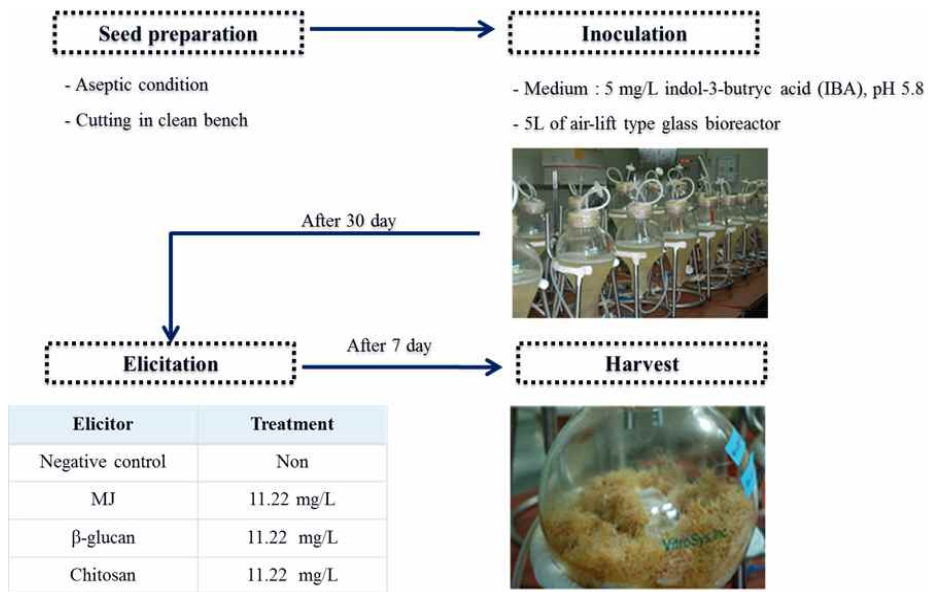


그림 3. 산삼배양근 조직배양 중 엘리시테이션 프로세스

Equipment	Acquity UPLC/Synapt G2-S HDMS
Flow rate	0.6 ml/min
Column	Acquity HSS C18, 100 * 1.7
Column oven temp.	45
Mobile phase	Water, 0.1% Formic acid in ACN (gradient, 0%~85%)
Run time (min)	15
Injection Volume	3ul

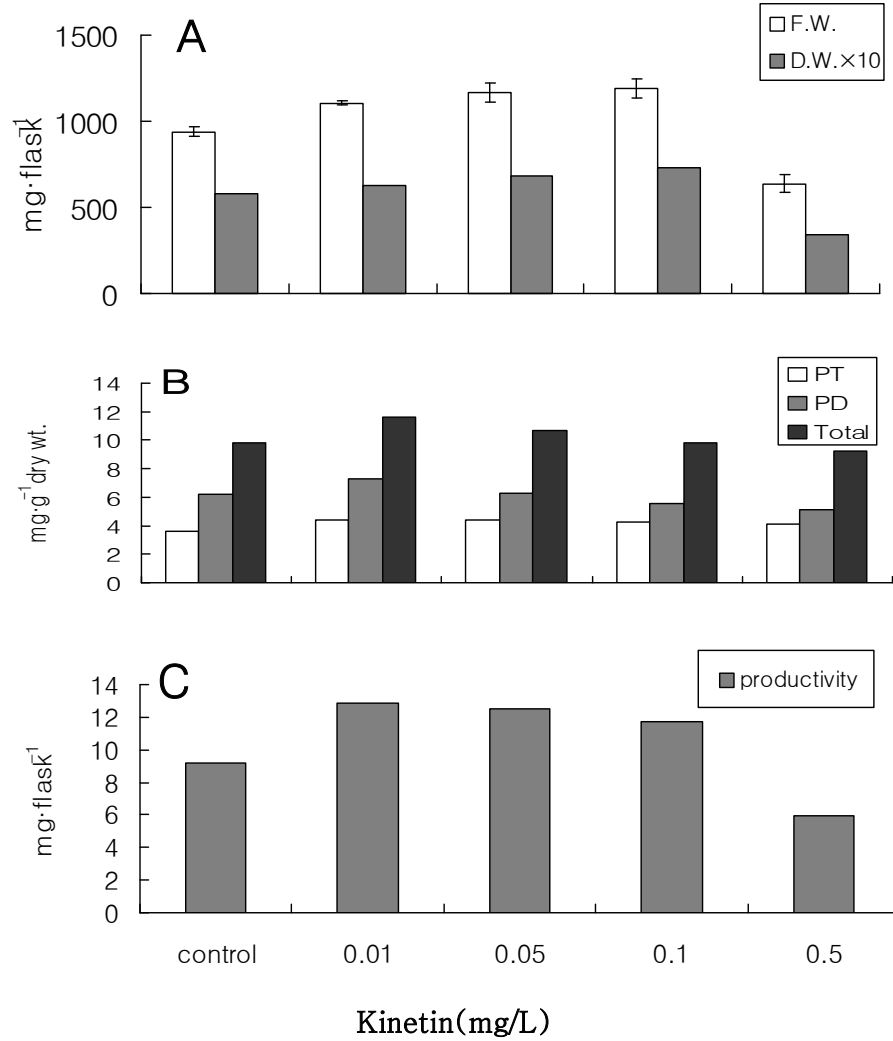
Equipment	Agilent 1200
Flow rate	1ml/min
Column	Thermohypersil gold 150*4.6
Column oven temp.	30
Detector	UV/VIS, 203nm
Mobile phase	Water, Acetonitrile (gradient, 0%~95%)
Run time (min)	90
Injection Volume	10ul

<그림> 기기분석 중 HPLC, LC-MS 최적 조건

다. 실험 결과

(1) 식물생장조절물질의 영향

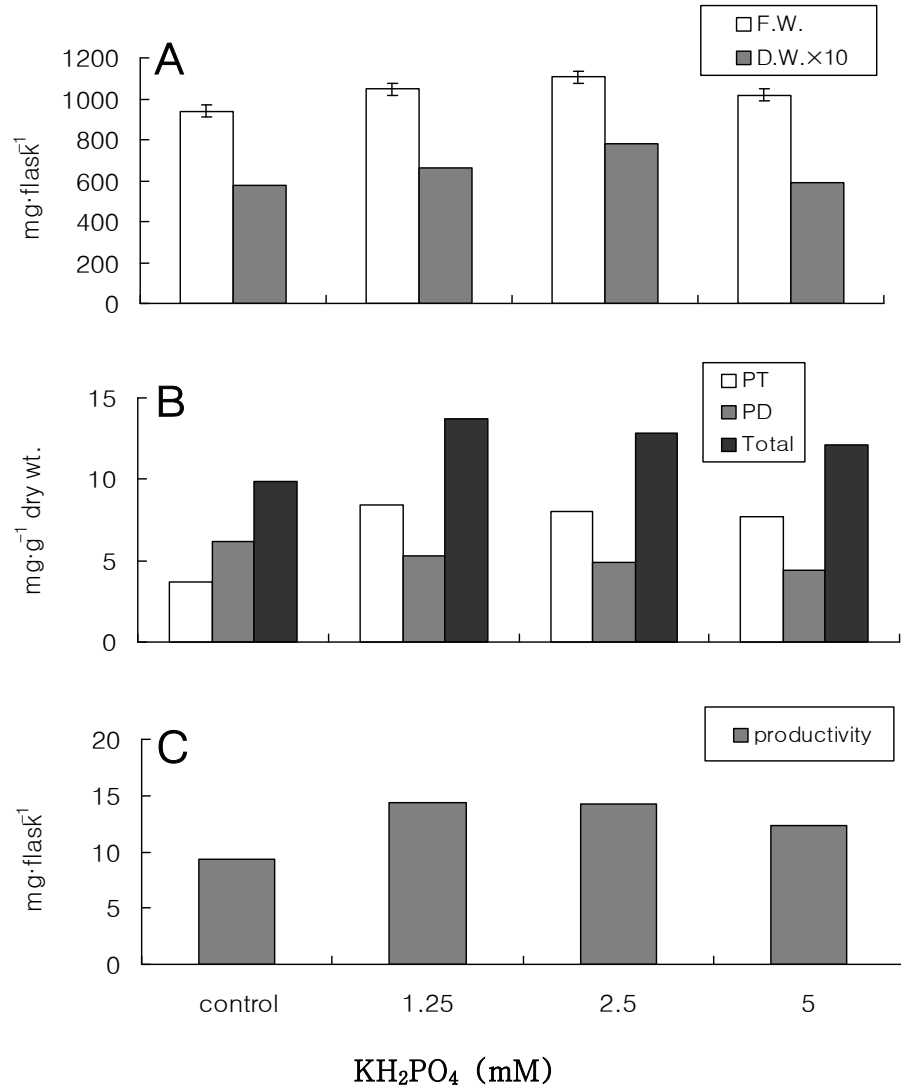
모상근의 경우에는 자체 조직내에 식물호르몬 합성 유전자가 들어 있기 때문에 식물 호르몬이 첨가되어 있지 않은 배지에서도 왕성이 생장이 가능하지만 정상조직인 부정근의 경우에는 식물호르몬을 첨가하여야 한다. 따라서 발근촉진제인 IBA가 첨가된 배지에 추가로 kinetin를 첨가하여 조사한 결과 0.05 - 0.1mg/l에서 무첨가 배지보다 생장은 양호하였으나 사포닌의 경우에는 0.01mg/l에서 더 양호하였다. 따라서 생산성은 kinetin 0.1에서 가장 양호한 경향을 보였다.



<그림> 인삼 천풍으로부터 유도된 부정근의 성장(A), 사포닌함량(B) 및 생산성(C)에 미치는 kinetin의 영향

(2) KH₂PO₄의 영향

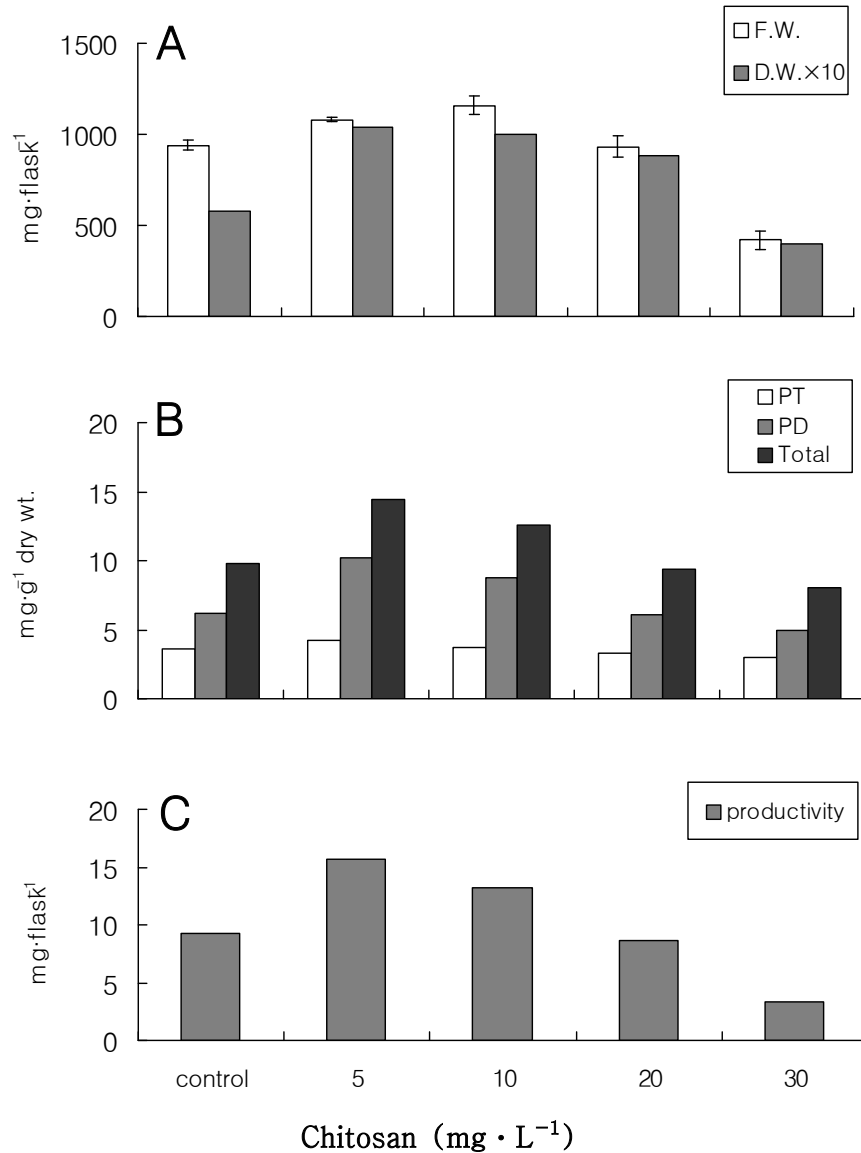
인삼 천풍에서 유도된 부정근의 성장에 미치는 KH₂PO₄의 영향을 조사한 결과 2.5mM 첨가배지에서 생장이 양호하였으나 사포닌의 합성은 1.25mM에서 더 양호한 경향을 보여 생산량은 1.25mM이 더 좋았다. 특히 KH₂PO₄의 추가 첨가시에는 무첨가배지보다 PT계열이 더 많이 형성되는 경향을 보였다.



<그림>인삼 천풍으로부터 유도된 부정근의 성장(A), 사포닌함량(B) 및 생산성(C)에 미치는 KH₂PO₄의 영향

(3) Chitosan의 영향

인삼 천풍에서 유도된 부정근의 성장에 미치는 elicitor로서 chitosan의 영향을 조사한 결과 10mg/l까지는 성장에 커다란 억제영향을 보이지 않았으며, 사포닌의 함량은 5mg/l에서 매우 증가되는 경향을 보여 생산성은 5mg/l가 가장 양호하였다.

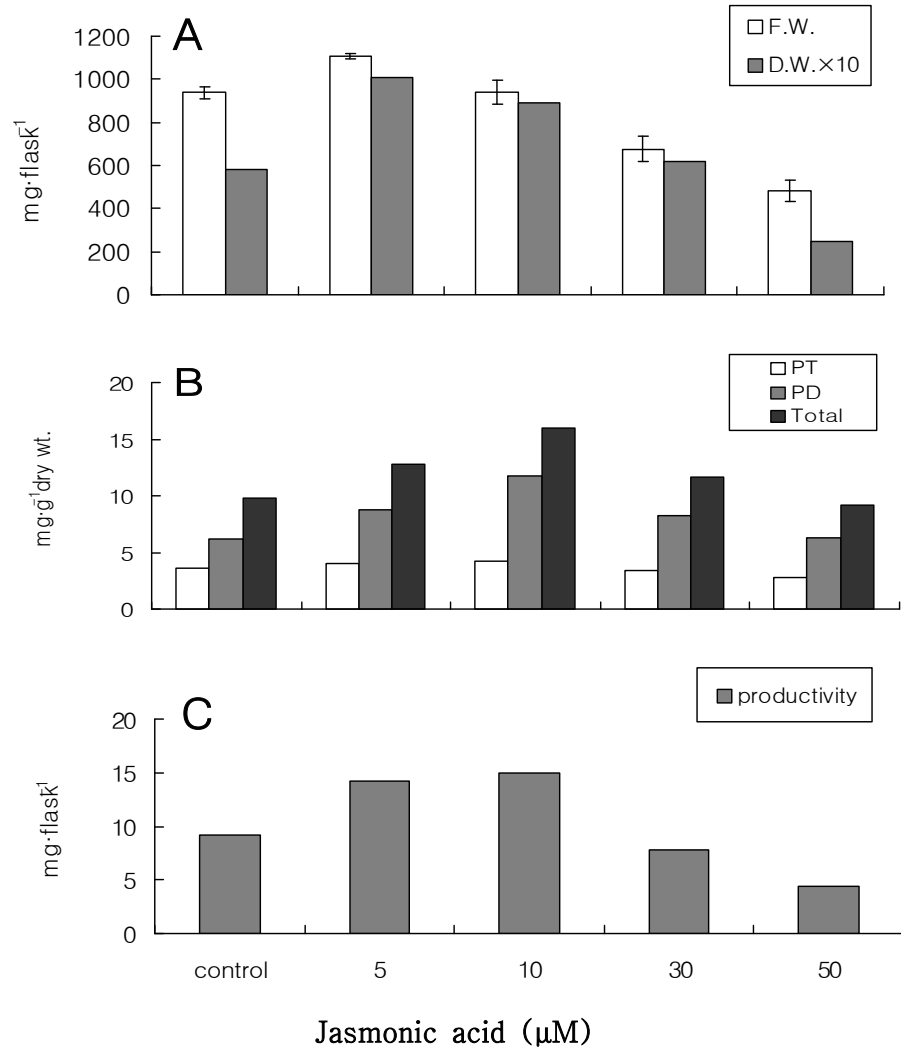


<그림> 인삼 천풍으로부터 유도된 부정근의 성장(A), 사포닌함량(B) 및 생산성(C)에 미치는 chitosan의 영향

(4) Jasmonic acid의 영향

인삼 천풍에서 유도된 부정근의 성장에 미치는 elicitor로서 jasmonic acid의 영향을 조사한 결과 5uM까지는 성장에 커다란 억제영향을 보이지 않았으나 그이상은 매우 생장이 저조하였다. 그러나 10uM에서 사포닌의 합성이 양호하여 전체적인 생산성은 jasmonic acid 10uM의 첨가가 가장 좋았다.

특히 jasmonic acid 첨가시에는 KH₂PO 와는 달리 PD계열이 증가하는 경향을 보였다.

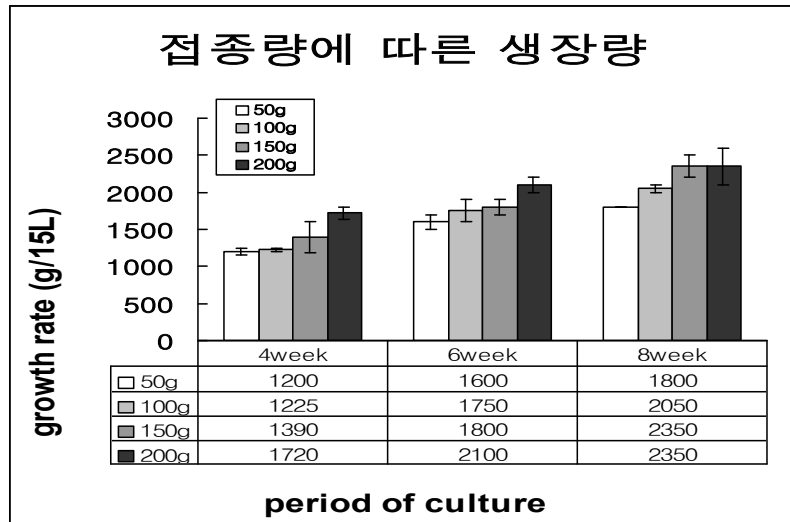


<그림> 인삼 천풍으로부터 유도된 부정근의 생장(A), 사포닌함량(B) 및 생산성

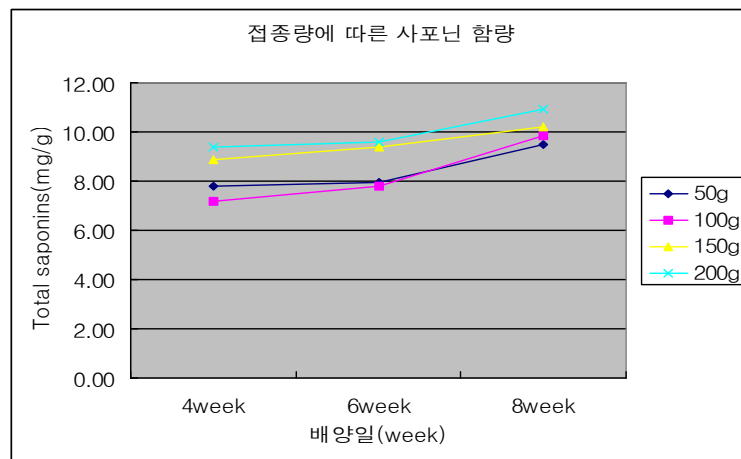
(5) 인삼 모상근의 접종량 차이에 의한 성장량 및 사포닌함량

현재 대량배양시스템은 접종량을 50g으로 하고 60일간(두달) 배양하고 있으나 접종량을 증가시켜 성장량 과 사포닌 함량을 조사한 결과 50g의 4배인 200g을 접종하였으나 60일 배양 후 50g접종하였을때보다 약 500g 정도 증가됨을 보였다.

접종량에 따른 ginsenosides 측정 결과 접종량이 증가 되었을 때 다소 증가되는 경향을 보였으며, 8주간의 배양에서 ginsenosides 함량이 높았다.



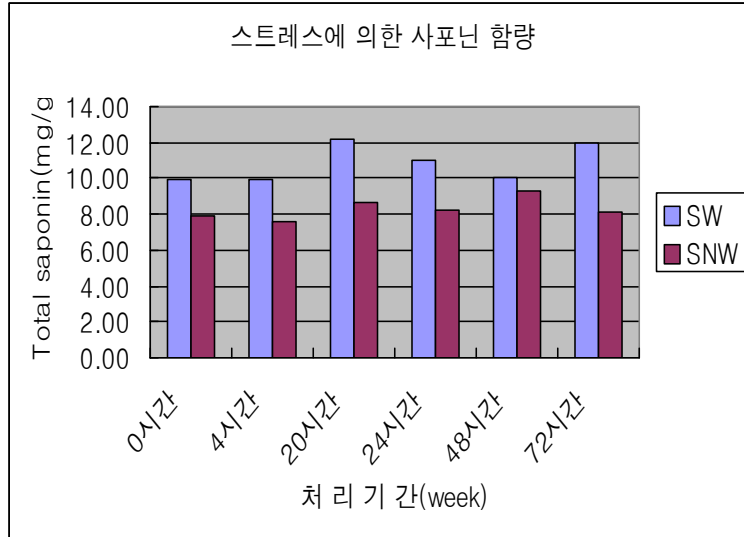
<그림> 인삼 모상근의 접종량에 따른 성장량 측정



<그림> 인삼 모상근의 접종량과 배양기간에 따른 ginsenosides의 함량

(6) 스트레스 처리에 의한 사포닌 함량증대

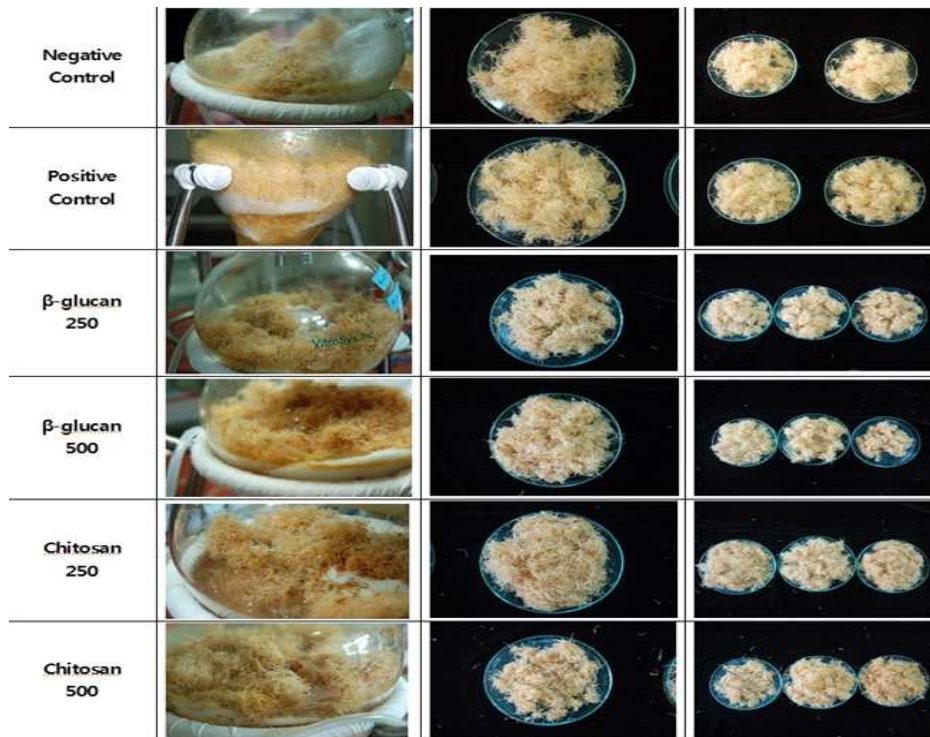
수확후 스트레스 처리에 의한 사포닌함량의 증대를 조사하기 위해서 수확한 인삼 모상근을 간단히 세척 후 상처를 주고(절단방법), 시간별로 경과 후 사포닌함량 조사 하였던 바, 처리 20시간 후에 사포닌의 함량이 다소 증가하는 경향을 보였다.



<그림> Wounding처리후 시간별 인삼모상근의 사포닌 함량 증대



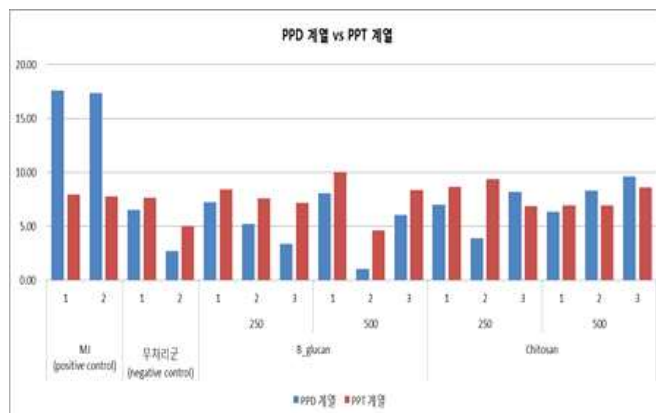
<그림> 산삼배양근 엘리시테이션 공정 후 배양 사진



<그림> 산삼배양근 조직배양 수확 후 엘리테이션 별 성장

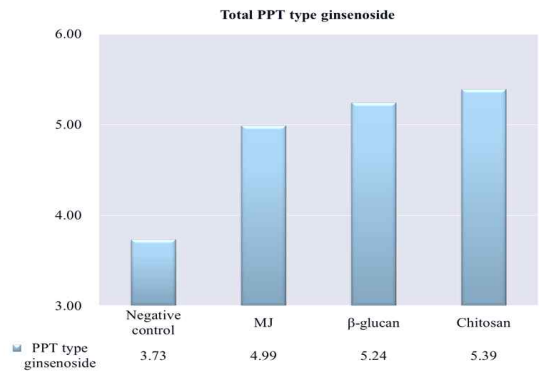
		MJ (positive control)		무처리군 (negative control)		B. glucan						Chitosan					
						250			500			250			500		
		1	2	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
PPT 계열	Re	440	358	312	189	3.66	3.40	2.98	3.54	2.58	3.60	3.70	2.99	2.84	3.23	2.88	3.48
	Rf	0.89	1.00	0.91	0.84	1.34	0.89	1.41	1.29	0.69	0.91	1.22	1.15	0.76	0.72	0.76	1.17
	Rg1	2.65	3.20	2.34	1.84	2.36	2.26	2.08	3.96	1.36	2.64	2.99	4.65	2.19	2.05	2.17	3.02
	Rg2	0.00	0.00	1.26	0.88	1.08	1.07	0.89	1.21	0.00	1.22	1.15	0.88	1.10	0.98	1.14	0.94
	합계	7.94	7.78	7.63	5.05	8.44	7.62	7.16	10.00	4.61	8.37	8.66	9.37	6.89	6.96	6.95	8.61
PPD 계열	Rb1	7.67	6.47	2.17	2.34	2.95	2.40	2.49	3.05	1.04	2.72	2.64	2.84	3.46	2.85	3.39	3.91
	Rb2	3.12	3.02	1.02	0.00	1.32	0.58	0.00	1.43	0.00	0.56	1.15	0.00	1.38	0.74	1.35	1.74
	Rc	3.79	4.93	2.38	0.00	2.06	1.39	0.89	2.25	0.00	1.34	2.30	0.00	2.09	1.55	2.42	2.48
	Rd	3.01	2.93	0.94	0.98	0.90	0.85	0.00	1.38	0.00	1.52	0.89	1.08	1.25	1.19	1.14	2.08
	합계	17.59	17.35	6.51	2.72	7.23	5.23	3.38	8.09	1.04	6.04	6.98	3.90	8.18	6.33	8.30	9.61
총 ginsenoside 합계		25.53	25.13	14.14	7.77	15.67	12.85	10.54	18.09	5.65	14.41	15.64	13.27	15.07	13.29	15.25	18.22

<그림> 조직배양 수확 후 엘리시터별 HPLC 분석결과

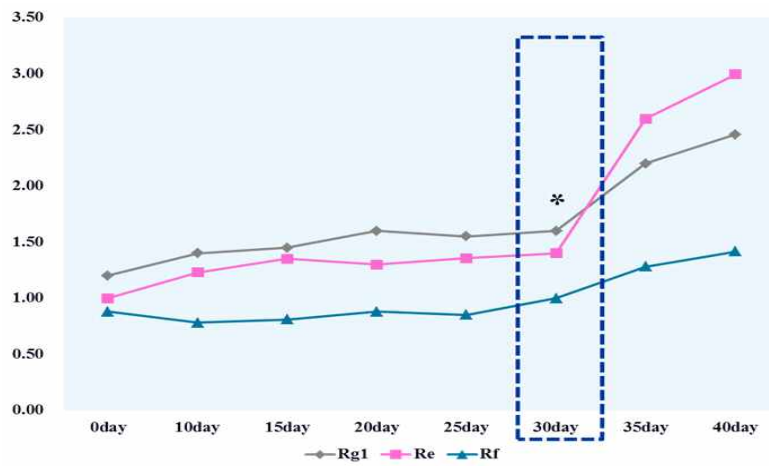


<그림> 조직배양 수확 후 엘리시터별 HPLC 분석결과 도식화

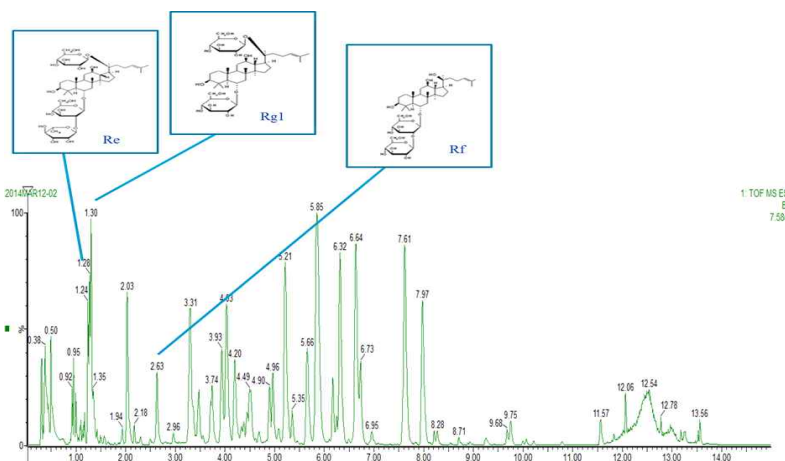
	Negative control	MJ	β -glucan	Chitosan
Re	0.94	1.34	1.25	1.45
Rf	0.78	0.95	1.35	1.34
Rg1	2.01	2.70	2.64	2.60
total	3.73	4.99	5.24	5.39



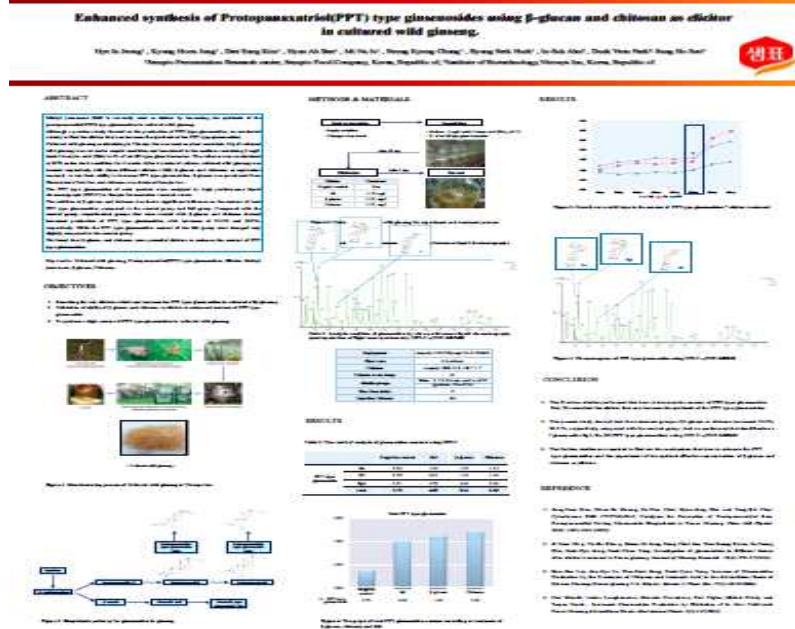
<그림>조직배양 수확 후 엘리시터별 HPLC 분석결과(11.22mg/L)



<그림>조직배양 수확 후 엘리시터별 HPLC 분석 중 PPT 계열의 변화(11.22mg/L)



<그림> 조직배양 수확 후 엘리시터별 LC-MS 분석결과(11.22mg/L)



<그림> 고려인삼학회(2014.11) 국제학술대회 포스터 발표

관인생략
출원번호통지서

출원 일자 2015.09.14
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원 번호 10-2015-0129784 (접수번호 1-1-2015-0891962-61)
 출원인 명칭 생표식품 주식회사(1-1998-001981-9)
 대리인 성명 김영철(9-1998-000040-3)
 발명자 성명 김대웅 정혜인 배현아 정승경 조미나 양현봉 전종은 허병석
 발명의 명칭 PPT 계열의 진세노사이드 함량을 증가시키는 인삼 조직배양방법

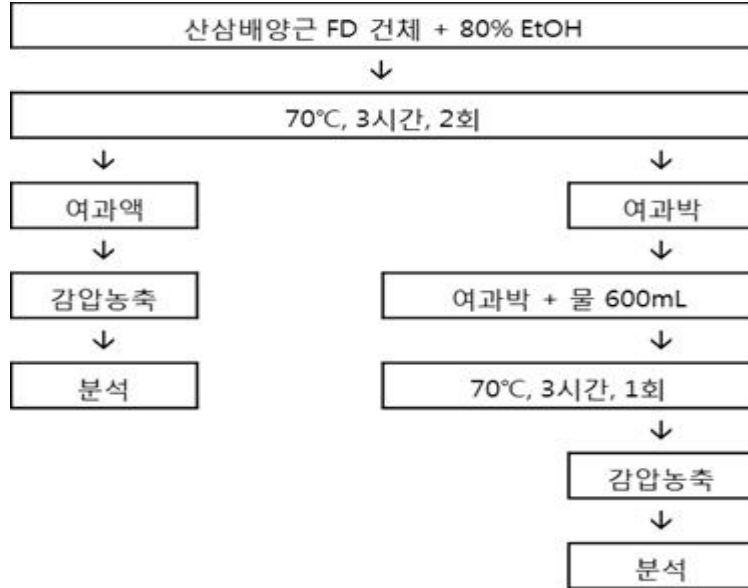
<그림> PPT 계열 진세노사이드 증폭 조직배양 방법 관련 특허 출원

(7) 고찰

- 천연물 소재로써의 엘리시터로 검토한 결과, 베타글루칸과 키토산의 경우 무처리군에 비하여 진세노사이드를 증폭시킴으로써 엘리시터로써 가능성이 있음을 알 수 있었음.
- 베타글루칸과 키토산은 무처리군에 비하여 각각 19.6%, 20.5%의 PPT 계열의 진세노사이드를 증폭시켰으며 HPLC와 LC-MS로 PPT 계열의 진세노사이드를 확인해본 결과, Re의 함량이 증가되었음을 알 수 있었음.
- 특히, 메틸자스모닉산(MJ)에 비하여 베타글루칸과 키토산을 엘리시터로 처리하였을 때 3-5.5%까지 PPT 계열의 진세노사이드가 증가되었음을 확인하였음.
- 최종 결과, 전체적인 PPD와 PPT 계열의 진세노사이드 모두를 증폭시키기 위해서는 메틸자스모닉산(MJ)과 베타글루칸을 혼합 병용하여 엘리시테이션하는 것으로 최적화하였음.(이 후 MJ-SP으로 명명함.)

2. 최적 엘리시테이션 조건의 산삼배양근(MJ-SP)의 농축액 제조 공정 확립

가. 산삼배양근(MJ-SP) 농축액 제조공정 확립



<그림> 농축액 제조공정도

	총량	고형분(brix)
추출전	150 g	100
EtOH 추출	4.1 L	21.1
EtOH 농축	40 g	73
최종수율	18.93 %	

<그림> 농축액 제조공정도

	PPT types(mg/g)								PPD types(mg/g)								계	총계	
	Re	Rf	Rg1	Rg2	Rh1	F1	M4	계	Rb1	Rb2	Rc	Rd	Rg3	Rh2	F2	CK			M12
1차 추출	3.64	0.34		1.82				9.25	4.45	2.30	2.48	4.59						13.84	19.65
MJ-SP 농축액	16.43	3.28						19.62	17.82	12.7	11.82	15.18	0.32	0.43	7.75			66.02	85.64

<그림> 농축액의 HPLC 분석 결과

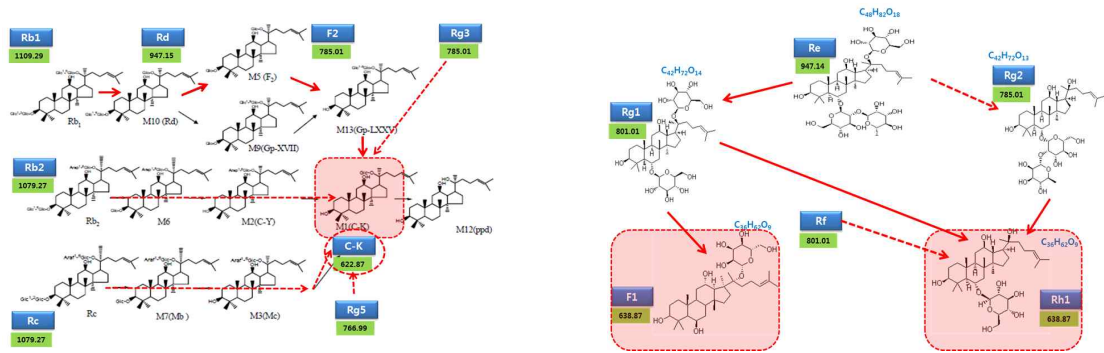
나. 고찰

- 10회 이상 추출하여 농축한 후 진세노사이드의 회수율을 검토한 결과, 추출 용매를 주정으로 선택하였음.
- 산삼배양근 생체 대비 농축액의 최종 수율은 18.9%이었으며 고형분 60(brix) 기준으로 진세노사이드 평균 함량은 85.6mg/g으로 분석되었음.

3. 발효진세노사이드 전환 프로세스 최적화

가. 개요

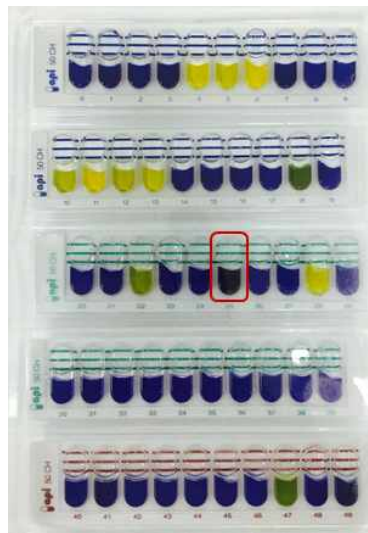
- 본 사업과제의 주관기관(경희대학교, 총괄책임:양덕춘교수)과의 연계협력을 통하여 신규로 확인된 유산균 2종 중 *L. Kimchicus* 를 전달받아 진세노사이드 전환 발효 공정에 사용하기로 함.
- 발효진세노사이드 중 기존에 물리적 변화를 통하여 전환될 수 있는 Rg3등이 아닌 미생물 발효에 의해서만 전환될 수 있는 체내 흡수가 빠르다고 알려져 있는 배당체 중 당이 1개 붙어 있으며 항산화 능력이 뛰어난 발효진세노사이드를 지표 물질로 설정하고자 함.
- 일반적으로 PPT 계열의 진세노사이드는 항산화 및 중추신경계에 효과적이며 PPD 계열의 진세노사이드는 항염증, 항산화등의 면역계에 효과가 있는 것으로 알려져 있음.
- 이에 발효진세노사이드 중 항산화능력이 뛰어난 PPD 계열의 진세노사이드 중 흡수가 빠르다고 알려져 있는 당이 1개 붙어 있는 Compound K와 PPT 계열에서 당이 1개 붙어 있는 F1, Rh1을 지표물질(품질 지표+기능성지표)로 설정하여 발효 공정을 표준화 하기로 함.
- PPD 계열 진세노사이드의 전환 pathway을 확인한 결과, 지표물질인 Compound K, F1, Rh1를 전환시키기 위해 효소, 산, 열처리 등의 복합적인 발효 공정을 필요로 하며 일정한공정 및 생산표준화를 위해 균일한 효소의 활성이 중요
- 기존 산업에 일반화된 발효홍삼의 제조 공정인 유산균 발효(1단계 발효)만으로는 지표물질인 Compound K, F1, Rh1의 발효진세노사이드 전환을 기대하기 어렵기 때문에 자사가 보유중인 국균을 통한 복합발효를 이용하여 타겟 지표물질인 발효 진세노사이드 Compound K, F1, Rh1을 얻고자 발효 공정을 디자인하였음.
- 주관기관인 경희대학교에서 전달 받은 유산균주인 *L. Kimchicus* 에서의 베타글루코시다제 활성을 측정하였고 자사에서 보유중인 국균 중 *A. oryzae* 에서의 나린지나제의 활성을 측정하였음.
- 최종 유산균 및 국균을 이용한 복합발효를 통하여 항산화능력이 뛰어난 발효진세드 사이드 Compound K, F1, Rh1의 전환을 최대화할 수 있는 발효공정 표준화를 확립하고자 하였음.



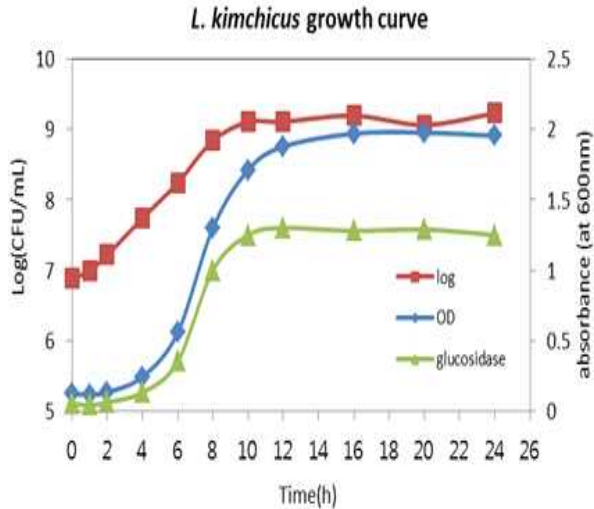
<그림> PPD/PPT 계열 진세노사이드 대사경로

나. 유산균의 베타글루코시다제의 활성 검정

- 베타글루코시다제의 정성 검정을 위해 API 키트를 이용하여 당 대사의 특성 중 25번 레인인 esculin의 이용성을 통하여 효소 활성을 확인하고자 함.
- API 키트 분석 결과, 25번 레인이 검게 변한 것을 통하여 *L. Kimchicus*의 베타글루코시다제의 활성을 확인하였음.
- *L. Kimchicus* 배양에 따라 베타글루코시다제의 정량 분석을 통하여 최적 배양 조건을 검토하고자 함.
- 베타글루코시다제의 정량을 위해 pNPG assay kit(Abnova)법을 사용하였으며 pNPG 분해능을 통하여 베타글루코시다제 활성을 정량하였음. (상등액을 조효소액으로 사용)



<그림> API 키트를 통한 베타글루코시다제 활성 확인

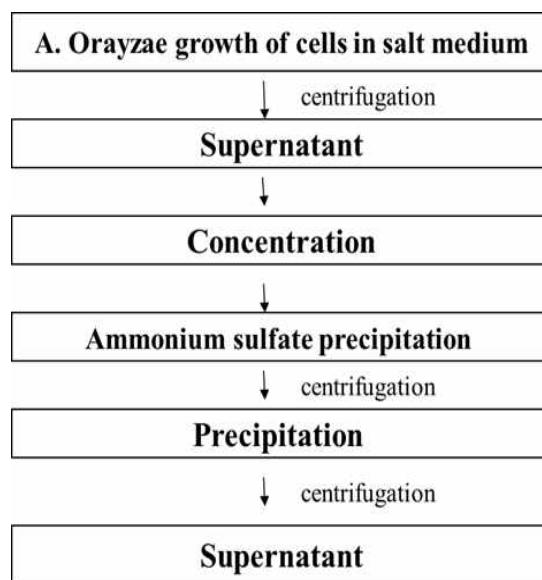


시간(hr)	CFU/mL	log	1/2 OD(at 600nm)	U/mL
0	8E+06	6.8808136	0.121	0.05
1	1E+07	6.9934362	0.116	0.04
2	2E+07	7.2174839	0.132	0.06
4	6E+07	7.7403627	0.242	0.13
6	2E+08	8.2442771	0.556	0.35
8	7E+08	8.8419848	1.301	1
10	1E+09	9.10721	1.713	1.25
12	1E+09	9.1139434	1.879	1.3
16	2E+09	9.1986571	1.972	1.28
20	1E+09	9.0663259	1.979	1.29
24	2E+09	9.2317244	1.956	1.25

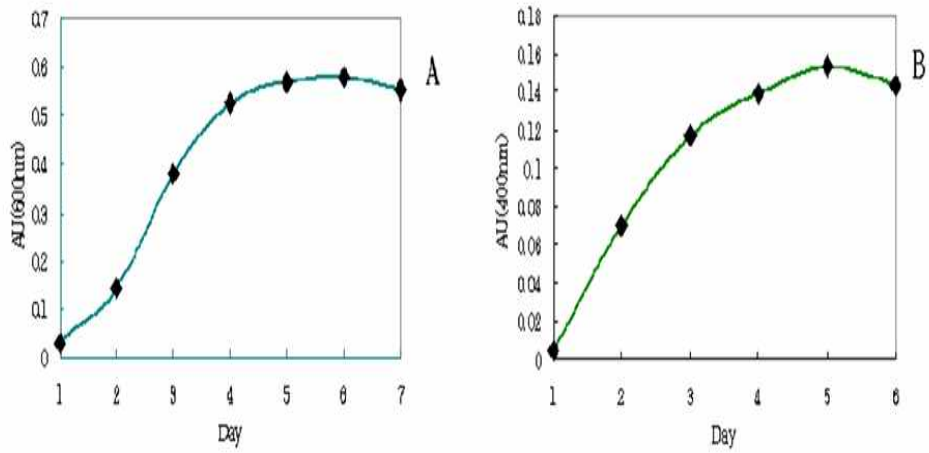
<그림> *L. Kimchicus* 생육곡선

다. *A. oryzae*(국균)의 나린지나제의 활성 검정

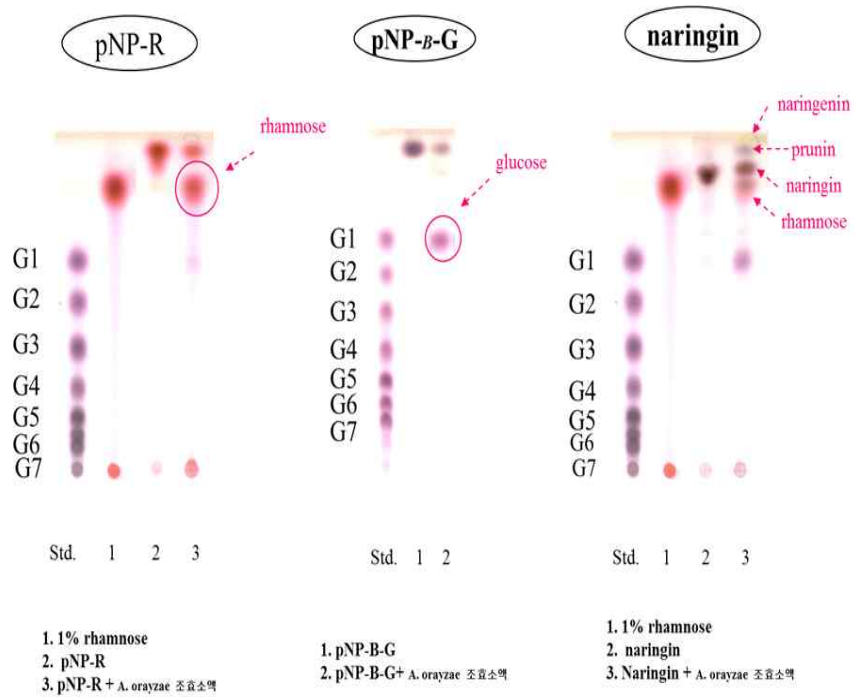
- *A. oryzae*(국균)의 나린지나제 효소 활성 검정을 위하여 조효소액을 Ammonium sulfate로 침전시킨 후, 최종 Sodium phosphate buffer(pH 7)로 투석하여 효소 활성 검정에 사용하였다.
- TLC를 이용하여 조효소액의 나린지나제의 효소활성을 정성/정량 확인하고자 함.
- *A. oryzae*(국균)의 배양에 따라 나린지나제의 정량 분석을 통하여 최적 배양 조건을 검토하고자 함.
- 나린지나제의 정량을 위해 pNPR assay kit법과 pNPG assay kit법을 이용하여 효소 활성을 정량하였음.



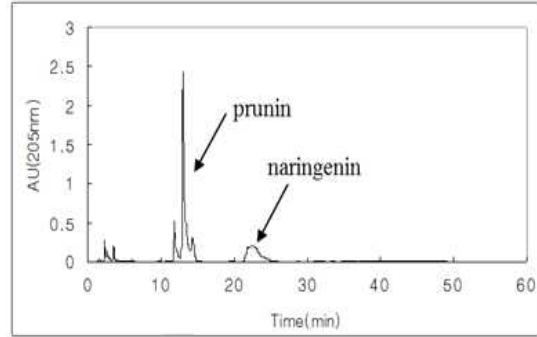
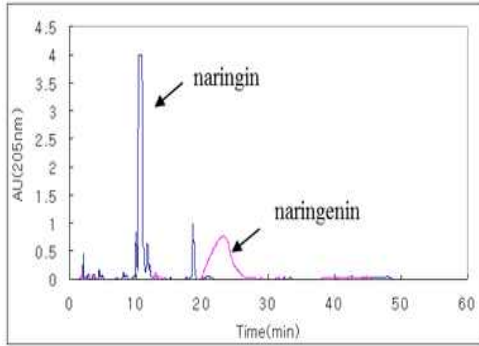
<그림> *A. oryzae*(국균)의 조효소액 제조과정



<그림> *A. oryzae*(국균) 생육곡선에 따른 효소 활성



<그림> TLC에 의한 *A. oryzae*(국균) 조효소액의 나린지나제 효소 활성 검정



<그림> HPLC에 의한 *A. oryzae*(국균) 조효소액의 효소 활성 검정

step	specific activity (U/mg)	recovery (%)	purification fold
crude	0.444	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.526	30	1.2

<그림> *A. oryzae*(국균) 조효소액의 나린지나제 효소 활성도

라. 고찰

- PPD 계열의 진세노사이드의 대사경로와 발효진세노사이드 중 항산화 기능이 뛰어나고 흡수가 빠른 발효진세노사이드 Compound K, F1, Rh1를 타겟 지표물질로 확정하였음.
- 경희대학교에서 제공받은 베타글루코시다제 활성이 있는 유산균인 *L. Kimchicus*과 나린지나제 활성이 있는 자사가 보유하고 있는 국균을 복합 발효를 함으로써 지표 물질 전환을 진행하였음.
- 나린지나제의 경우, 조효소액의 효소 역가를 확인한 결과, 배양여액과 효소침전한 1차 정제물와의 활성 차이가 0.08U/mg로 미비하며 회수율의 경우 70%가 감소함에 따라 이 후 발효공정 표준화에 적용 시에는 배양여액을 사용하는 것으로 결정하였음.

4. 발효진세노사이드 전환 발효공정 최적화

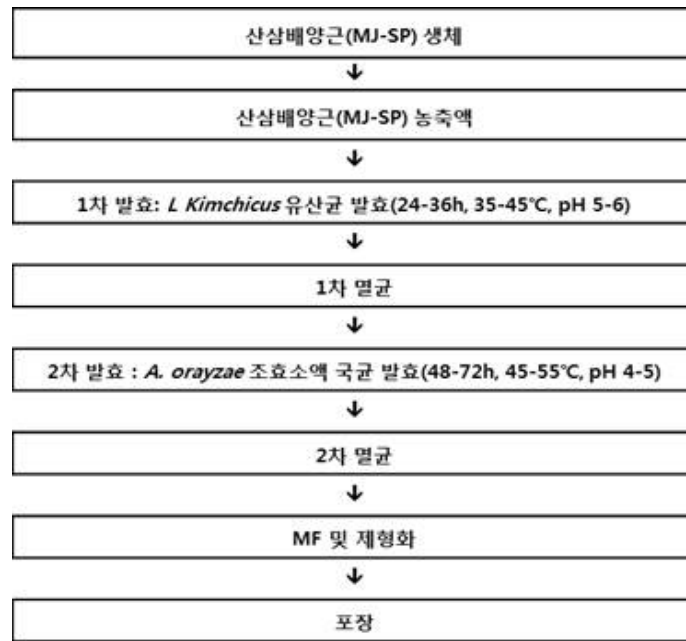
가. 개요

- 유산균 및 국균을 이용한 복합발효를 통하여 항산화능력이 뛰어난 발효진세노사이드 Compound K, F1, Rh1의 전환을 최대화할 수 있는 발효 공정을 Flask-->5L-->30L-->500L fermentation 단계적인 scale-up을 통하여 표준화를 확립하고자 하였음.
- Flask scale을 통하여 지표물질인 발효진세노사이드 Compound K, F1, Rh1 전환을 TLC을 이용하여 확인하고자 함.
- 5L Fermentation scale을 통하여 지표물질인 발효진세노사이드 Compound K, F1,

Rh1 전환을 HPLC를 이용하여 확인하고자 함.

- 30L Fermentation scale을 통하여 지표물질인 발효진세노사이드 Compound K, F1, Rh1 전환에 대한 재현성 검정을 통하여 생산 scale 전 발효공정을 확립하고자 함.
- Production scale인 500L Fermentation을 통하여 발효진세노사이드 Compound K, F1, Rh1 전환에 대한 발효 제조공정 표준화를 구축하고자 함.

나. 발효공정 프로세스



<그림> 발효진세노사이드 전환 복합 발효 프로세스

다. 기기분석 조건

- TLC(Thin Layer Chromatography)

① 실험재료 : silica gel 60F254 (Merck, aluminum sheets)

② 전개용매조건 : PPD 계열 진세노사이드 분석

: CHCl₃:MeOH:D.W=60:40:10 또는 70:30:4

PPT 계열 진세노사이드 분석 : CHCl₃:MeOH:D.W=30:10:1

③ 발색조건 : 10% H₂SO₄에 침지 후, 110°C oven에서 10-20분 말린 후 발색함.

- HPLC(High Performance Liquid Chromatography)

: Sample을 syringe filter 0.45µm로 filtering 한 후 분석을 실시함.

검량선 작성을 위한 진세노사이드 Standard 는 엠보연구소에서 구입하여 사용

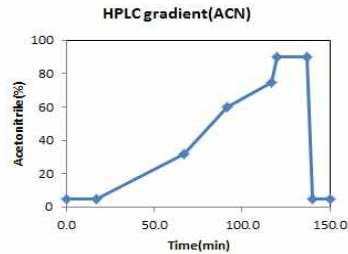
① 기기명: Agilent 1200 series.

② Flow Rate: 1ml/min

③ Detector: UV/Vis 203nm

- ④ Column: Thermo Synchronis C18 (4.6*250mm, 5um, USA)
- ⑤ Injection Volume: 10ul
- ⑥ Mobile Phase: A buffer- 100% D.D.W, B buffer: 100% ACN
Gradient 조건:

Time(min)	ACN(%)
0.0	5
16.7	5
66.7	32
91.7	60
116.7	75
120.1	90
136.7	90
140.0	5
150.0	5



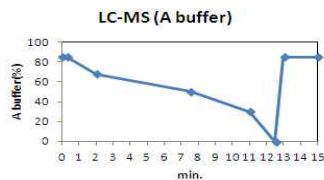
- LC-MS

● LC 조건

: Sample을 syringe filter 0.22μm로 filtering 한 후 분석을 실시함.

- ① System: Acquity UPLC/Synapt G2-S HDMS
- ② Column: Acquity HSS C18 , 1.7 um 2.1X100 mm
- ③ Column Temp: 45 °C
- ④ Sample Temp.: 10°C
- ⑤ Injection Vol. : 3 μL
- ⑥ Flow rate: 0.6ml/min
- ⑦ Mobile Phase: A:0.1% Formic acid in H2O, B:0.1% FA in ACN
Gradient 조건:

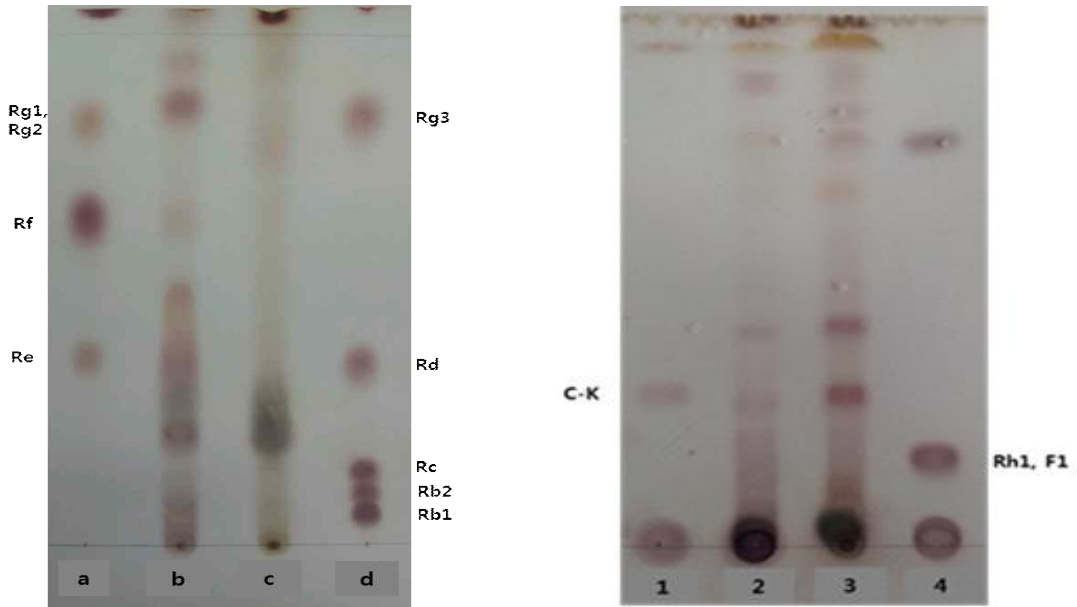
Time(min)	A %	Curve
0	85	
0.3	85	6
2	68	6
7.5	50	6
11	30	6
12.5	0	6
13	85	6
15	85	6



● MS 조건

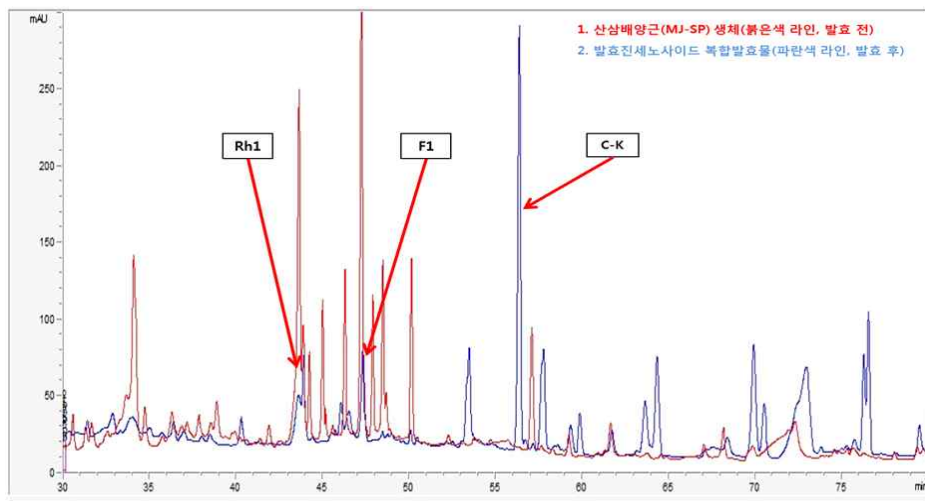
- ① Ionization Mode : ESI Negative MSE (High Resolution mode)
- ② Scan Range : 50-1500
- ③ Scan Time: 0.1 sec
- ④ Capillary voltage: 2.5 kV
- ⑤ Sampling cone: 30.0
- ⑥ Source Temperature: 120°C
- ⑦ Desolvation Temp: 400°C
- ⑧ Desolvation gas flow: 700 L/hr

다. 실험 결과



<그림> 발효진세노사이드 전환 TLC 결과

- line a : PPT 타입 진세노사이드 표준물질 mixture,
- line b : 산삼배양근(MJ-SP) 생체,
- line c : 발효진세노사이드 전환 복합발효물_flask scale,
- line d : PPD 타입 진세노사이드 표준물질 mixture,
- line 1 : PPD 타입 진세노사이드 표준물질 mixture,
- line 2 : 산삼배양근(MJ-SP) 생체,
- line 3 : 발효진세노사이드 전환 복합발효물_flask scale,
- line 4 : PPT 타입 진세노사이드 표준물질 mixture)



<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 HPLC Over-lay peak 결과

		Flask				5L 발효조				30L 발효조			
		산상태량근 (MJ-SP)		발효 진세노사이드		산상태량근 (MJ-SP)		발효 진세노사이드		산상태량근 (MJ-SP)		발효 진세노사이드	
		mg/g	μmol	mg/g	μmol	mg/g	μmol	mg/g	μmol	mg/g	μmol	mg/g	μmol
PPT 계열	Rg1	1.52	1.60	0.00	0.00	1.88	1.98	0.00	0.00	2.05	2.16	0.00	0.00
	Re	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Rf	1.32	1.65	0.00	0.00	1.22	1.52	0.00	0.00	1.42	1.77	0.00	0.00
	Rg2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Rh1	0.00	0.00	1.42	2.22	0.00	0.00	0.85	1.33	0.00	0.00	1.21	1.89
	F1	0.00	0.00	0.53	0.83	0.00	0.00	0.49	0.78	0.00	0.00	0.55	0.88
	합계	2.84	3.25	1.95	3.05	3.10	3.51	1.34	2.11	3.47	3.94	1.76	2.77
PPD 계열	Rb1	1.82	1.64	0.00	0.00	1.70	1.53	0.00	0.00	1.99	1.79	0.00	0.00
	Rb2	4.27	3.96	0.00	0.00	3.58	3.32	0.00	0.00	4.63	4.29	0.00	0.00
	Rc	1.13	1.05	0.00	0.00	1.25	1.16	0.00	0.00	0.96	0.89	0.00	0.00
	Rd	2.42	2.56	0.00	0.00	2.82	2.98	0.00	0.00	1.82	1.92	0.00	0.00
	Rg3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.45	0.00	0.00	0.00	0.00
	Rh2	0.00	0.00	0.52	0.83	0.00	0.00	0.45	0.72	0.00	0.00	0.72	1.16
	F2	0.00	0.00	2.05	2.61	0.00	0.00	1.55	1.97	0.00	0.00	0.96	1.22
	CK	0.00	0.00	2.78	4.46	0.00	0.00	2.35	3.77	0.00	0.00	1.89	3.03
	합계	9.64	9.20	5.35	7.91	9.35	8.99	4.70	6.92	9.40	8.89	3.57	5.42
	총 진세노사이드	12.48	12.45	7.30	10.96	12.45	12.49	6.04	9.03	12.87	12.83	5.33	8.19

<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 scale-up에 따른 HPLC 결과-1

발효진세노사이드 (지표물질)	5L fermentation scale (10회 반복 평균)	30L fermentation scale (5회 반복 평균)	500L fermentation scale (3회 반복 평균)
C-K (mg/g)	2.12	1.02	1.36
Rh1 (mg/g)	1.14	1.60	1.74
F1 (mg/g)	1.17	0.59	0.91
합 계	4.43	3.21	4.01

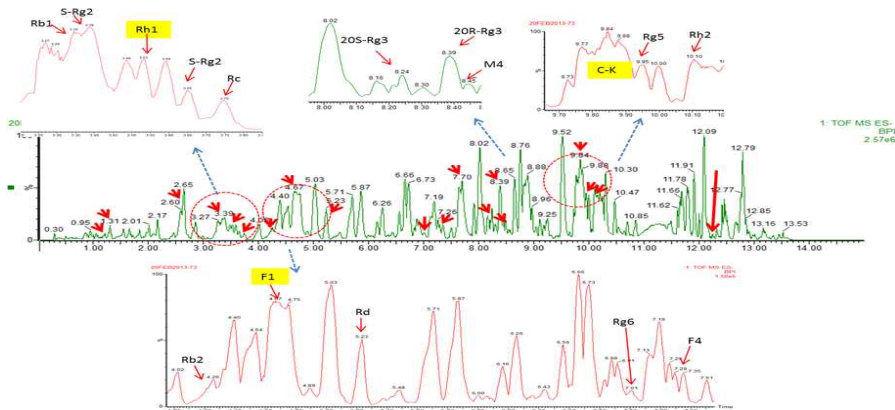
<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 scale-up에 따른 HPLC 결과-2



<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 Scale-up 프로세스

peak	compound	Retention time (s), min	Formula [M-H+CH ₂ O ₂]	PPM	Formula [M]	[M-H+CH ₂ O ₂] [m/z]	[M] [m/z]	MS/MS fragments (m/z)
1	Rb1	3.31	C55H93O25	0.3	C54H92O23	1153.6006	1108.6006	783.4895, 621.4366
2	Rb2	4.22	C54H91O24	0.1	C53H90O22	1123.5900	1078.5900	945.5423, 915.5317
3	Rc	3.75	C54H91O24	0.8	C53H90O22	1123.5909	1078.5909	945.5423, 783.4895
4	Rd	5.23	C49H83O20	0.8	C48H82O18	991.5486	946.5486	783.4895, 621.4366
5	Re	1.27	C49H83O20	0.8	C48H82O18	991.5486	946.5486	799.4844, 783.4895
6	[20S]Rg-3	8.24	C43H73O15	0.4	C42H72O13	829.4954	784.4954	621.4366, 555.4049
7	[20R]Rg-3	8.39	C43H73O15	0.4	C42H72O13	829.4954	784.4954	621.4366, 555.4049
8	Compound-K (C-K)	9.78	C37H63O10	0.2	C36H62O8	667.4423	622.4423	459.3838
9	Rh2	10.10	C37H63O10		C36H62O8	667.4423	622.4423	
10	Rh1	3.53	C37H63O11	0.1	C36H62O9	683.4371	638.4371	475.3787
11	Rb3	6.08	C54H91O24		C53H90O22	1123.5900	1078.5900	945.783, 621
12	Rg5	9.95	C43H71O14		C42H70O12	811.4852	766.4852	603.441
13	Rg6	7.01	C43H71O14		C42H70O12	811.4852	766.4852	619.457
14	F4	7.29	C43H71O14		C42H70O12	811.4852	766.4852	619.457
15	Rg1	1.30	C43H73O16	0.2	C42H72O14	845.4902	800.4902	637.4316, 475.3787
16	S-Rg2	3.38	C43H73O15	0.7	C42H72O13	829.4955	784.4955	637.4316, 475.3787
17	R-Rg2	3.63	C43H73O15	0.7	C42H72O13	829.4955	784.4955	
18	F2	7.70	C43H73O15	0.7	C42H72O13	829.4955	784.4955	
19	Rf	2.63	C43H73O16	0.1	C42H72O14	845.4900	800.4900	637.4316, 475.3787
20	F1	4.73	C37H63O11	0.1	C36H62O9	683.4371	638.4371	475.3787
21	Rh4	7.62	C37H61O10	0.2	C36H60O8	665.4290	620.4290	679.457
22	RK3	7.31	C37H61O10	0.2	C36H60O8	665.4290	620.4290	679.457

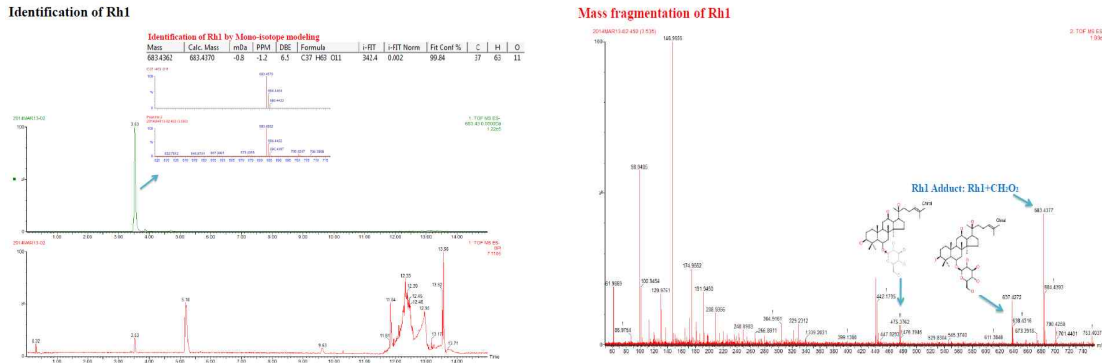
<그림> LC-MS 내 진세노사이드 분석 항목 리스트



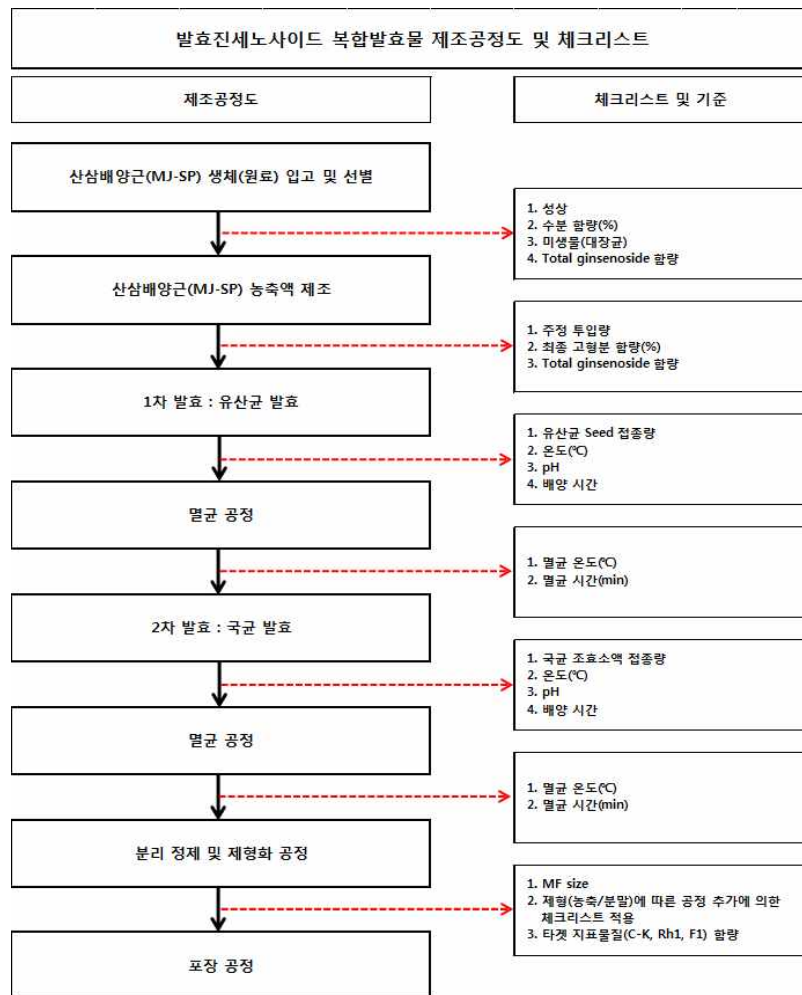
<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 LC-MS 검정 peak 데이터

peak	compound	Retention time (t _R), min	Formula [M-H+CH ₂ O ₂]	Formula [M]	[M-H+CH ₂ O ₂] (m/z)	[M] (m/z) -45	MS/MS fragments (m/z)
8	Compound-K(C-K)	9.78	C37H63O10	C36H62O8	667.4423	622.4423	459.3838
10	Rh1	3.53	C37H63O11	C36H62O9	683.4371	638.4371	475.3787
20	F1	4.73	C37H63O11	C36H62O9	683.4371	638.4371	475.3787

<그림> 발효진세노사이드 복합발효물의 지표물질의 LC-MS 검정



<그림> 발효진세노사이드 복합발효물의 지표물질 중 Rh1의 LC-MS 검정



<그림> 발효진세노사이드 발효공정 표준화에 따른 체크리스트

라. 고찰

- Flask-->5L-->30L-->500L fermentation 단계적인 scale-up을 통하여 표준화를 확인한 결과, 발효진세노사이드 지표물질 중 Compound K, Rh1, F1의 함량에 대한 재현성은 5L와 500L fermentor에서는 확인이 되었으나 30L fermentor의 경우 전반적으로 지표물질의 함량이 30-50%에서 감소되는 경향을 나타내었음.
- 모든 조건을 동일하게 적용하였으나 30L fermentor의 경우 자체 기계적 결함에 의해 Airation에 대한 편차가 있는 문제점으로 인하여 발효진세노사이드 전환이 다소 떨어지는 경향을 나타내었음.
- 최종 production scale인 500L fermentor의 발효공정 표준화를 통하여 지표물질인 발효진세노사이드 Compound K, Rh1, F1의 합계는 평균 4.01mg/g으로 전환이 되었음을 확인하였음.

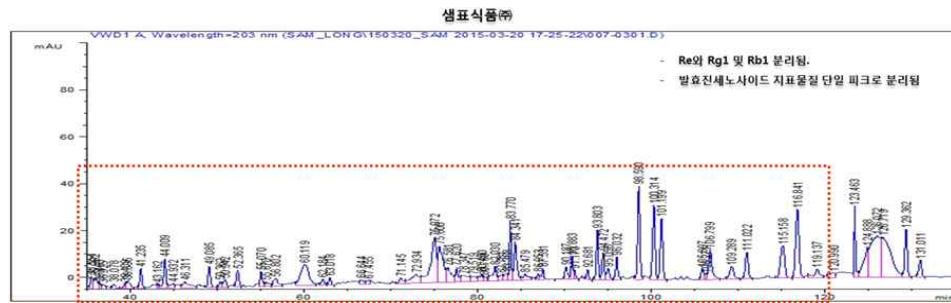
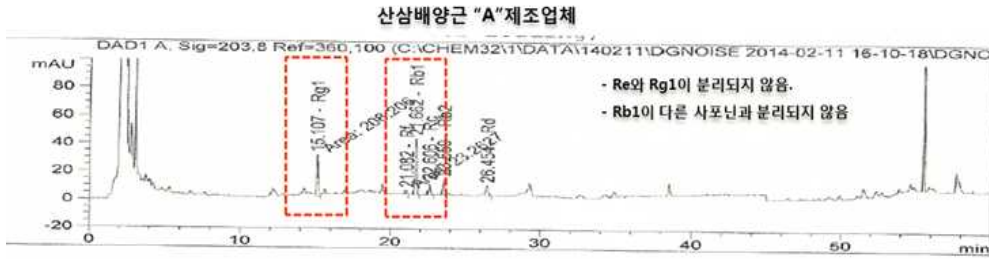
5. 발효진세노사이드 기기분석 표준화 구축

가. 개요

- 한국천연물연구소, 건강기능식품공전, 조직배양 사업을 진행하고 있는 산삼배양근 제조업체별로 각각 진세노사이드 HPLC 분석 조건이 상이함에 따라 같은 시료를 분석함에도 업체별로 진세노사이드 함량에 대한 편차가 심함.
- 발효진세노사이드 지표물질에 대한 분석표준화를 통하여 발효공정 및 생산에 대한 표준화가 확립됨에 따라 각 업체별로 셋팅되어 있는 HPLC의 분석 조건을 검토한 후, 문제점을 파악하여 보완해야 함.
- 많은 진세노사이드의 종류와 유사한 극성도에 따라 분리능이 매우 떨어짐으로써 peak가 겹치게 되어 정확한 정량값을 확인하지 못함에 발효공정 생산 표준화에 어려움이 있음.

	샘플식품(가)	산삼배양근 "A" 제조업체	산삼배양근 "B" 제조업체	건강기능식품공전
분석 기기	Agilent 1200	Agilent 1200	Waters 600E	-
Flow rate	1ml/min	1ml/min	1.5ml/min	1ml/min
Column	Thermohypersil gold 150*4.6	Eclipse XDBC-18 250*4.6	Hypersil Gold 150*4.6	C18 Reverse 일체
Column oven temp.	30	30	30	30
Detector	UV/VIS, 203nm	UV/VIS, 203nm	UV/PDA, 203nm	UV/VIS, 203nm
Mobile phase	Water, Acetonitrile (gradient, 0%~95%)	Water, Acetonitrile (gradient, 20%~95%)	Water, Acetonitrile (gradient, 20%~80%)	Water, Acetonitrile (gradient, 20%~80%)
Run time (min)	120	60	90	50
분석 가능 진세노사이드 수	21종	16종	15종	2종
Reference	1. 경희대학교 인삼사업단 2. 영보연구소(Std. 제조) 3. 한국천연물신약연구소			일부 권장 사항

<그림> 각 업체별 진세노사이드 HPLC 분석 조건



<그림> 각 업체별 진세노사이드 HPLC 분석 peak 데이터

나. 고찰

- HPLC 분석에 대한 신뢰도를 높이기 위해 진세노사이드 공인성적발급기관과 진세노사이드 표준물질을 판매하고 있는 업체에서 사용중인 분석 조건을 토대로 하여 발효진세노사이드 지표물질인 Compound K, Rh1, F1의 분리능을 높이기 위해 선택적으로 조건을 변형하였음.
- 비극성의 진세노사이드를 효과적으로 분리하기 위해 C18 컬럼의 성능을 기존 hypercil 등급에서 비극성 친화도가 강한 resin으로 충전되어 있는 hypercil-Gold로 향상시켰으며 또한 Run time을 기존 90분에서 120분으로 하여 peak 분리능을 향상시켰음.
- Mobile phase gradient 조건을 달리하여 PPT/PPD 계열의 발효진세노사이드의 극성 친화도를 이용하여 분리능을 향상시켰음.
- 기존 산삼배양근 제조업체에서 보여주는 HPLC 분석에서의 단점인 Re와 Rg1, 그리고 Rb1의 피크 겹침 현상이 없어짐에 따라 정확한 정량이 가능하였음.
- 또한 발효진세노사이드 지표물질인 Compound K, Rh1, F1 peak가 단일로 분리되어 정확한 정량 측정이 가능함에 따라 발효공정 표준화를 확립하였음.

6. 기능성 관련 추출, 분리, 정제 기기 분석, *in vitro*, *in vivo* 프로세스 구축

가. 샘플제조 및 항산화 활성 평가

(1) 발효진세노사이드 복합발효물 샘플 제조

- SHC-1 : 타겟 진세노사이드(C-K+Rh1+F1)(mg/kg) 100mg/kg 함유 샘플
- SHC-3 : 타겟 진세노사이드(C-K+Rh1+F1)(mg/kg) 300mg/kg 함유 샘플
- SHC-4 : 타겟 진세노사이드(C-K+Rh1+F1)(mg/kg) 400mg/kg 함유 샘플
- SMG-DW : 비발효(산삼배양근 열수추출물) 샘플

(2) 항산화 활성 분석

(가) 시약 조제

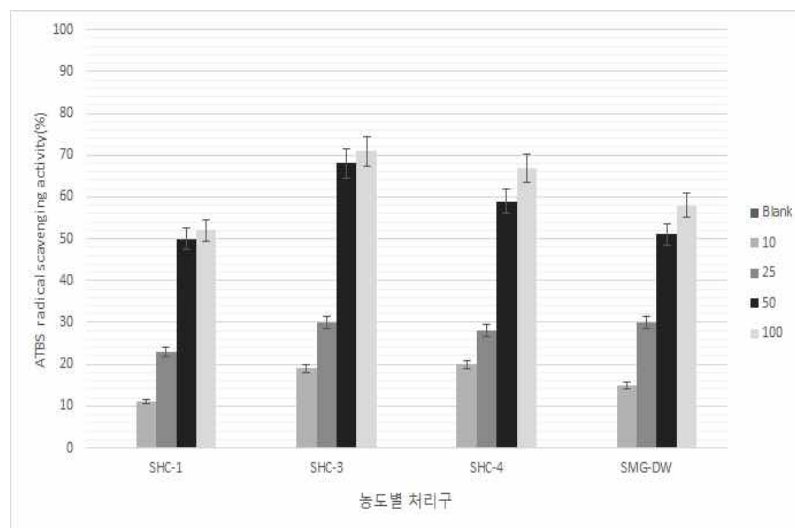
- 1 mM DPPH 용액 제조 : ethanol에 녹여 갈색병에 보관하여 사용함.
- ABTS·+ 용액 제조 7 mM ABTS 및 2.5 mM potassium persulfate 용액을 증류수에 녹여 제조한 후 두 용액을 동량 혼합하여 12시간 동안 방치(4℃, 암소)하여 radical을 형성시켰다. ABTS radical 용액을 735 nm에서 흡광도 값이 0.800±0.020 되도록 EtOH로 희석하여 사용함.

(나) DPPH, ABTS 항산화 활성 측정

$$\text{radical 소거 활성(\%)} = 100 - \frac{\text{시험물질 첨가군 흡광도}}{\text{무첨가군 흡광도}} \times 100$$

(다) DPPH 항산화 활성 평가 결과

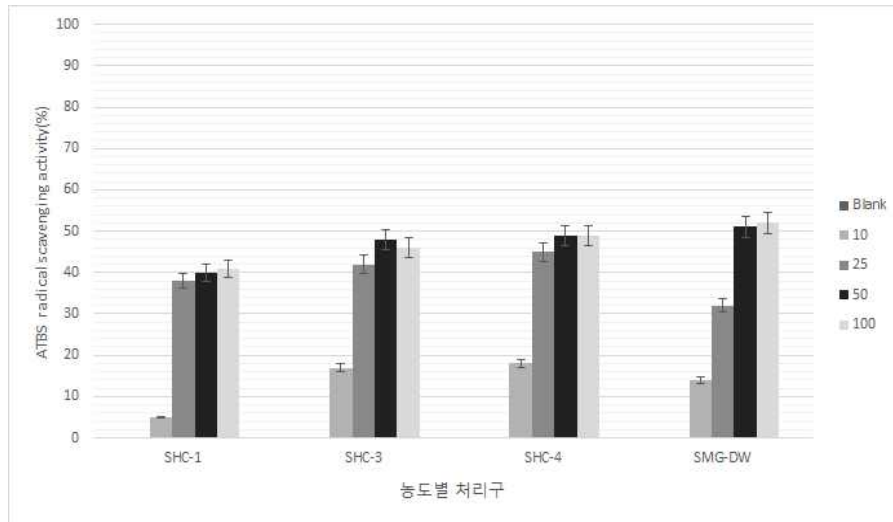
- 시험용액을 시험관에 넣고 ethanol 및 1mM DPPH 용액을 순차적으로 가함. 위 시험액을 암소에서 30분간 정치시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정함. Control은 추출물 대신 ethanol을 첨가하여 흡광도를 측정함.



<그림>DPPH 항산화 활성 평가 결과

(3) ABTS 항산화 활성 평가 결과

- 시험용액을 시험관에 넣고 증류수 및 ABTS radical를 순차적으로 가한 후 위 시험액을 암소에서 30분간 정치시킨 후 735 nm에서 흡광도를 측정함.
Control은 추출물 대신 증류수를 첨가하여 흡광도를 측정함.

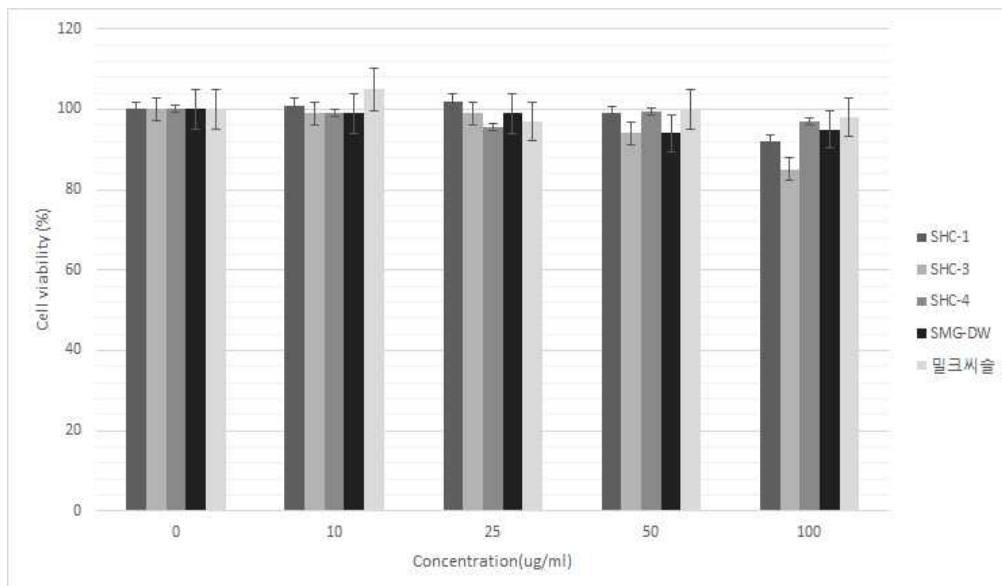


<그림> ABTS 항산화 활성 평가 결과

나. In-vitro test

(1) 세포독성 평가

- 세포독성을 Raw264.7 세포를 이용하여 측정된 결과, SHC-1, SHC-3, SCH-4, SMG-DW은 모두 약 100 ug/ml의 농도까지는 안전한 것으로 확인하였음

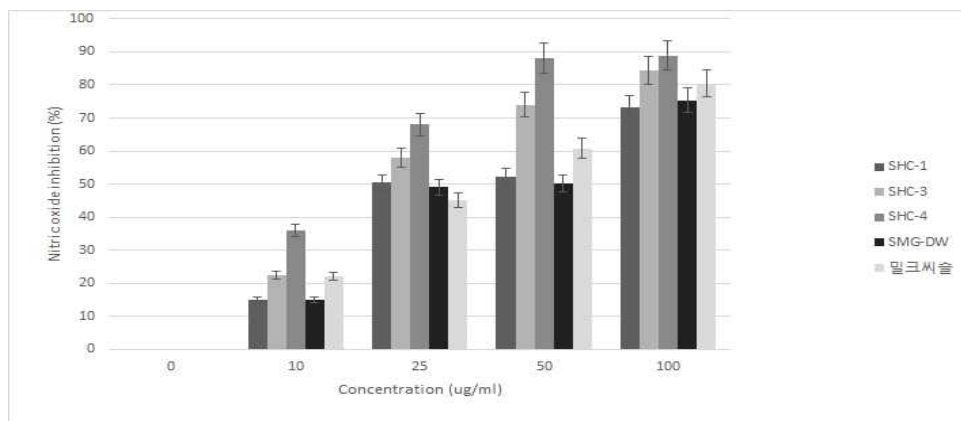


<그림> Raw254 세포독성 평가 결과

(2) NO test

- RAW264.7 세포를 24well cell culture plate에 2×10^5 cells/well 농도로 seeding 한 후 10% fetal bovine serum(FBS), 1% Penicillin/ Streptomycin이 첨가된 DMEM 배양액으로 24시간 배양. 그 후 lipopolysaccharide(LPS, 1ug/ml)와 시료가 농도별로 포함된 DMEM (1% Penicillin/Streptomycin) 배양액으로 교체하여 24시간 배양함.

배양이 끝난 후 세포 배양액만 수거하여 Nitric Oxide Detection kit (intron 21021) 시약을 이용하여 NO 생성량을 산출하였음.



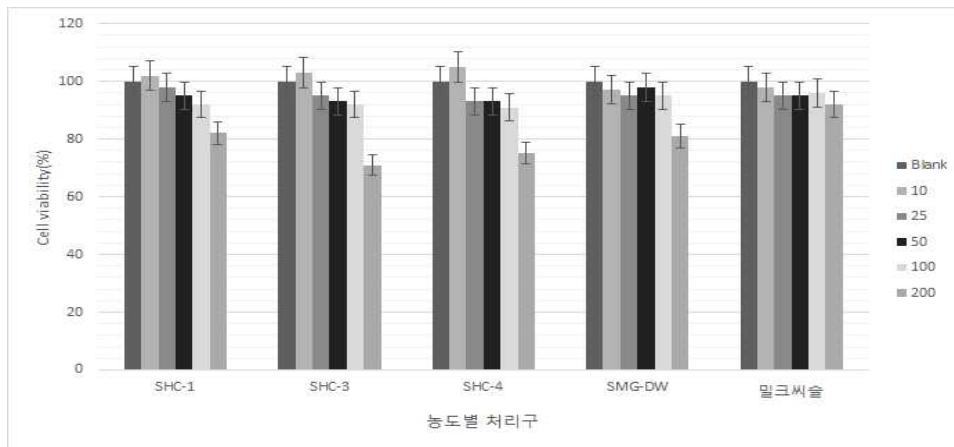
<그림> NO test 결과

(3) 에탄올 손상 CYP2E1 transfected HepG2 세포의 보호효과

- 세포 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 환원 방법을 이용하여 측정하였음.
- CYP2E1 transfected HepG2 세포를 5×10^4 의 밀도로 24-well plate(Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM) 배지에 접종하여 24시간 배양하였음.
- 배양 후 각각의 발효진세노사이드 복합발효물 샘플을 농도별로 첨가하고 37°C, 5% CO2 조건에서 6일간 배양하였음.
- 배양 후 PBS로 세척하고 MTT를 DMEM 배지에 10배 희석시켜 그 희석액을 1 mL 첨가하여 37°C에서 4시간 배양시키고 배지를 버리고 DMSO를 첨가하여 상온에서 10분 동안 녹이고 570 nm에서 흡광도를 측정하였음.
- 각각의 샘플에 에탄올에 의해 손상된 CYP2E1 transfected HepG2 세포의 보호 효과는 MTT 환원 방법과 동일한 농도로 CYP2E1 transfected HepG2 세포를 넣고 배양하였음.
- 24시간 배양 후 세포를 5% FBS가 첨가된 DMEM 배지로 교체하였으며 에탄올을 투입하기 30분 전에 각각의 발효진세노사이드 복합발효물을 투입하였음.
- 에탄올을 200mM의 농도로 처리하여 37°C, 5% CO2 조건에서 24시간 배양하였

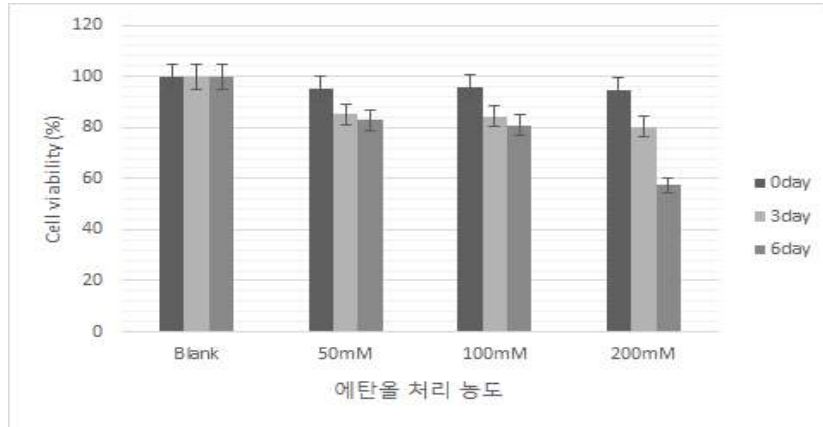
으며 3일 및 6일간 동일한 처리를 하였다. 3일과 6일배양 후 PBS로 세척한 다음 MTT(2.5 mg/mL)를 DMEM배지에 10배 희석시켜 그 희석액을 1 mL 첨가하여 37°C에서 4시간 배양시켰음.

- 그 후 배지를 버리고 DMSO 0.5 mL를 첨가하여 상온에서 10분 동안 완전히 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였음.
- 샘플의 세포독성과 알코올에 의해 유도된 독성에 대한 보호효과를 CYP2E1 transfected HepG2 세포주를 이용하여 측정하였음.
- 10, 25, 50, 100, 200 µg/mL의 농도로 각각 세포에 샘플을 처리 하고 MTT법에 의한 세포 독성을 측정한 결과 10, 25, 50, 100, 200 µg/mL 무처리구와 비교하여 세포성장에 영향을 주는 것으로 나타났으며 대부분의 시료가 100 µg/mL의 농도까지는 세포성장에 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났음(생존율 80% 이상).



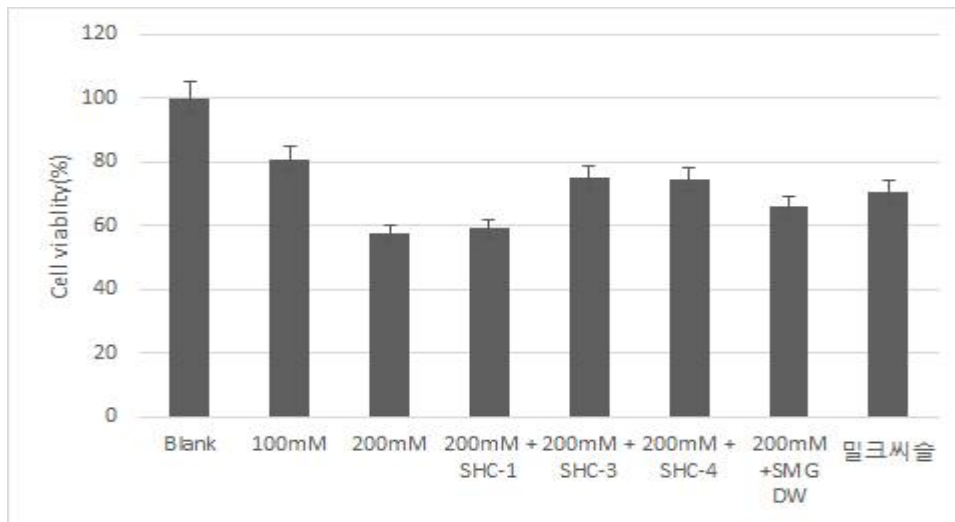
<그림> 세포독성 결과

- 시료를 처리하지 않고 에탄올만 처리하였을 경우 50mM, 100mM과 200 mM의 농도에서 3일간 처리하였을 때 각각 95%, 84.5%, 80.9%의 100 mM의 높은 세포 생존율을 나타내어 무처리구와 큰 차이가 없었음.
- 또한 6일간 100 mM과 200mM의 농도로 각각 에탄올만 처리하였을 경우 각각 82.8%, 80.9%, 57.5.%의 세포생존율을 나타내어 알코올에 의한 세포독성 보호효과를 알아보기 위한 에탄올 처리 농도를 200 mM의 농도로 설정하였음.



<그림> 에탄올 처리 농도에 따른 세포생존율 결과

- 따라서 에탄올을 200 mM의 농도로 처리하고 동시에 각각의 샘플을 100 μ g/mL의 농도로 처리하여 각각의 발효진세노사이드 복합발효물이 알코올에 의한 세포독성에 미치는 영향을 알아보았음.
- 200 mM의 에탄올과 샘플을 6일간 처리하였을 경우 SHC-1을 제외한 모든 처리군에서 유의적으로 세포 생존율의 증가가 확인되었음.

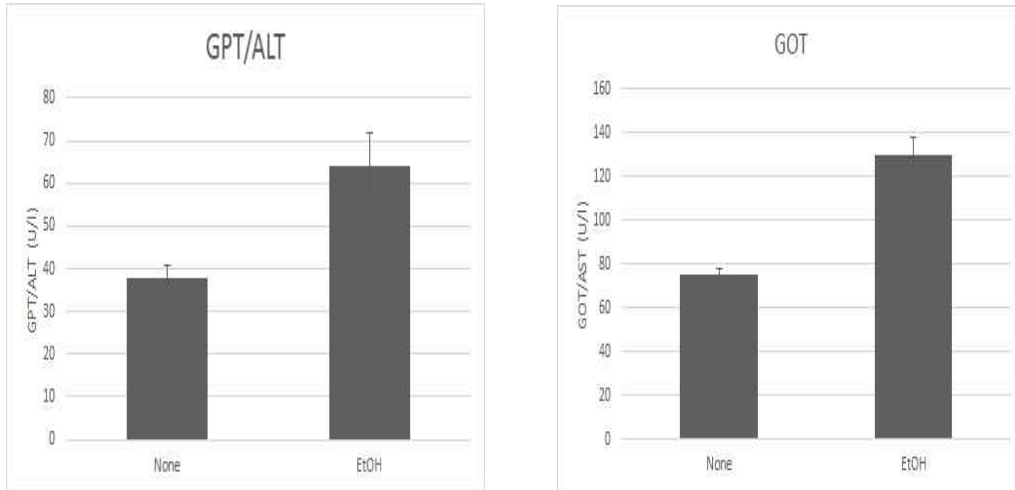


<그림> 에탄올 독성에 따른 발효진세노사이드 복합발효물의 세포생존율 결과

다. In-vivo test

(1) 에탄올 투여에 의한 간독성 유도시험

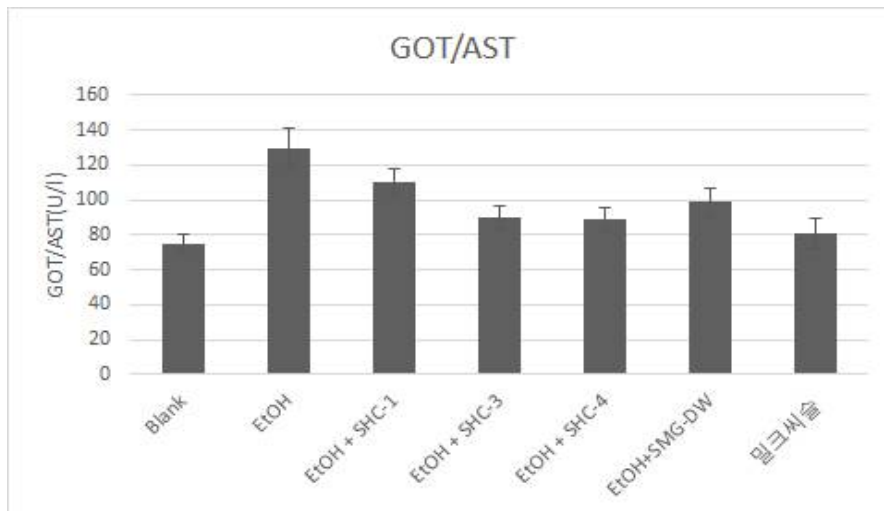
- 에탄올 투여에 의한 간독성 유도시험은 25% ethanol을 5 g/kg의 양으로 1일 1회 총 7일간 투여하는 방식으로 실시함. 그 결과 간독성의 지표인 GOR/AST, GPT/ALT 및 LDH의 혈중농도가 증가하여, 에탄올 투여에 의해 간세포가 손상되어 독성이 발현된 것으로 나타남.



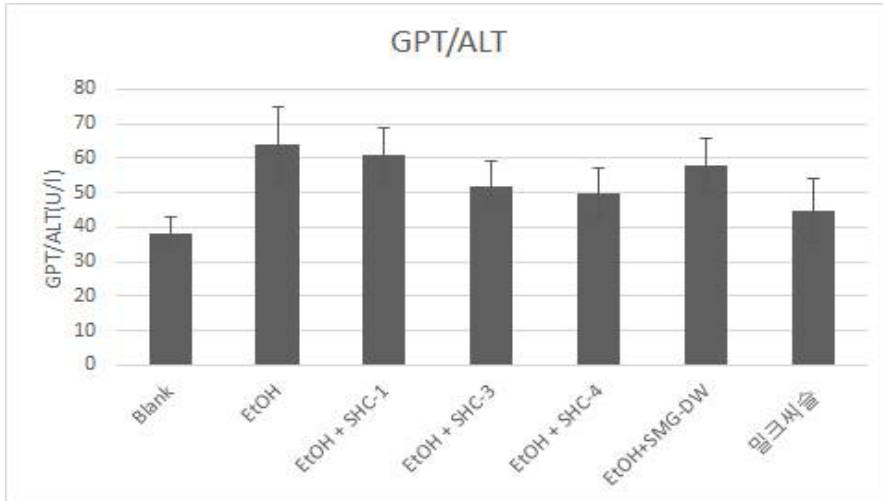
<그림> 에탄올 투여에 의한 간독성 유도시험 결과

(2) 동물모델에서 간독성 억제효과

- 공시시료를 에탄올 투여 3일 전부터 경구투여한 마우스에서, 혈청 중의 AST 및 ALT를 정량하여 시료의 간질환 억제활성을 판정한 결과, 에탄올 투여에 의해 상승한 혈중 AST/ALT의 수치가 샘플 투여에 의해 감소하였을 확인함.



<그림> 에탄올 투여에 따른 발효진세노사이드 복합발효물의 간독성 억제 결과_1



<그림> 에탄올 투여에 따른 발효진세노사이드 복합발효물의 간독성 억제 결과_2

라. 고찰

- (1) 각 샘플에 대한 활성 결과, 항산화에 효과 있는 샘플은 SHC-3(타겟 진세노사이드 함량 300mg/kg)이며 최적 농도는 50ug/ug/ml 이상으로 확인되었음.
- (2) In vitro 및 In vivo 테스트 중 에탄올 독성에 대한 간보호 효능이 가장 뛰어난 샘플은 SHC-3(타겟 진세노사이드 함량 300mg/kg)으로 확인되었음.
- (3) 발효진세노사이드 복합발효물의 품질/효능 지표로써 최종 품질 규격은 타겟 진세노사이드(C-K, Rh1, F1) 함량은 300mg/kg 이상으로 확립하였음.

7. 항산화/피로회복 기능성 시장 동향 및 현황 조사

가. 전체 음료 시장 현황 조사

(1) 조사기관



일회 주문용 주문약한 및 약한

고객:	생료식품 우리별연구중심	서비스 형태:	CPS 음료시장 현황분석 보고서
주소:	충청북도 청원군 오송읍 만수리 471	선적일:	2016.3.25
담당자:	박세정 과장(마케팅리서치)	서비스 대표:	이경수 부장
전화:	02-3393-5382	사무실:	서울특별시 중구 중림동 419 센트럴플레이스빌딩 16층
Fax:		주말일:	2016.3.3

서비스 사양 (표준형이 아닌 경우: 스포츠드링크, 에너지드링크, 홍삼음료시장 Snapshot 포함 PPT report(Retail data 포함))

특이 사항:

제본 조건들

소유권, 라이선스 보고서, 자료, 분석 (이해 정보와 함) 자료 사전, 참조 도구, 자료 영문본, 자료 특성 및 속성 (이해 참조물)이라 함) 소프트웨어 (이하 "소프트웨어") 및 기타의 지적재산 (이하 "재산")이라 함은 모두 닐슨의 소유이다. 고객은 전용용 목적을 내부적으로 사용하기 위한 제한적이고 비독점적인 실시권(라이선스)을 서비스 기간 동안 보유한다. 고객은 정보의 일부를 제한적으로 발행하여 제품 마케팅에 도움이 되는 범위 내에서 모회사, 관련회사, 자회사, 광고대상자, 협력 스폰서, 경쟁인, 유통업체 및 도매상에게 유출할 수 있다. 또한 고객 및 소비자 광고, 연보, 금융계좌추적, 증권 애플리케이션 등 제 3자에게 제공할 수 있으며 기업 이미지 형성 또는 제품 판촉을 위하여 미디어(신문, TV, 라디오, 인터넷 출판)에 배포할 수 있다. 고객은 또한 닐슨의 제 3 자 접근법에서 서명하는 컨실턴트에게 정보를 제공할 수 있다. 이러한 모든 경우에

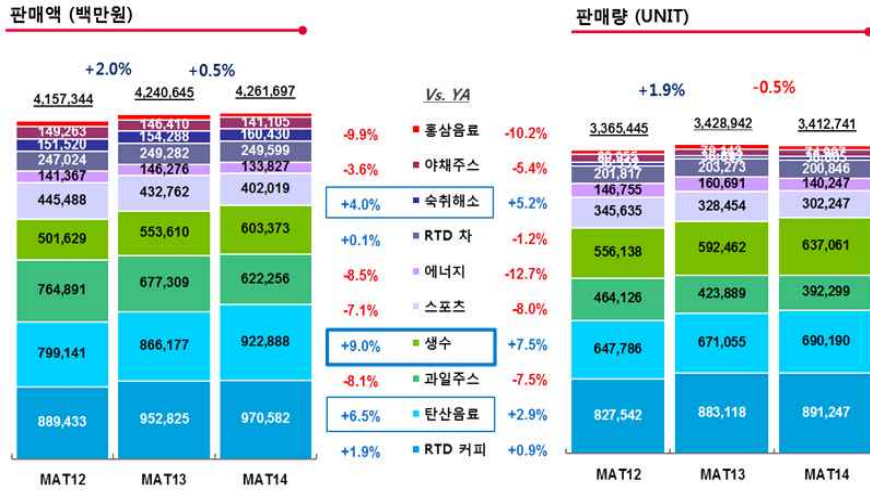


<그림> 닐슨컴퍼니코리아 주문계약서 사본 및 결과보고서

(2) 전체 음료시장 현황 분석 결과

[전체 음료] 품목 별 연간 판매 규모

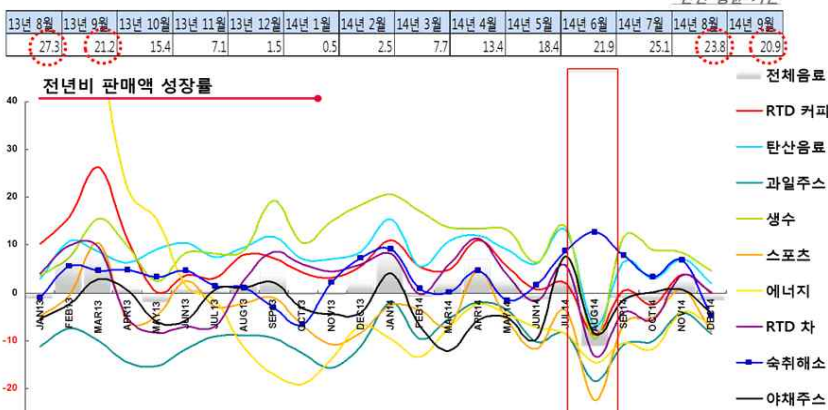
기준: 전국, 판매액(백만원), 판매액(%), MAT(1-12월)



<그림> 품목별 연간 판매 규모

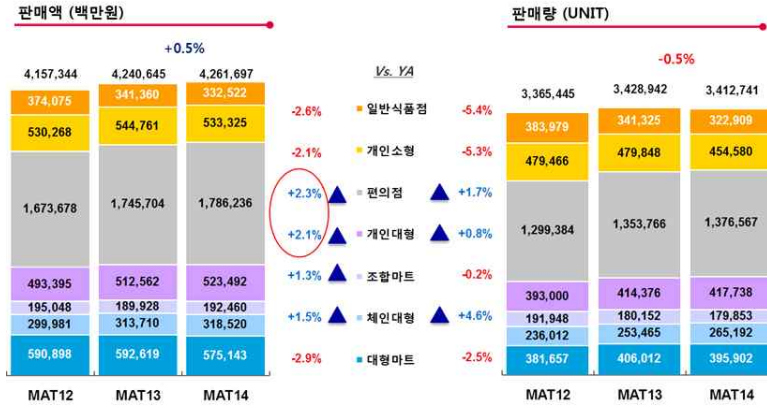
[전체 음료] 품목 별 기간별 전년비 성장률 추이

기준: 전국, 전년비 판매액 성장률%



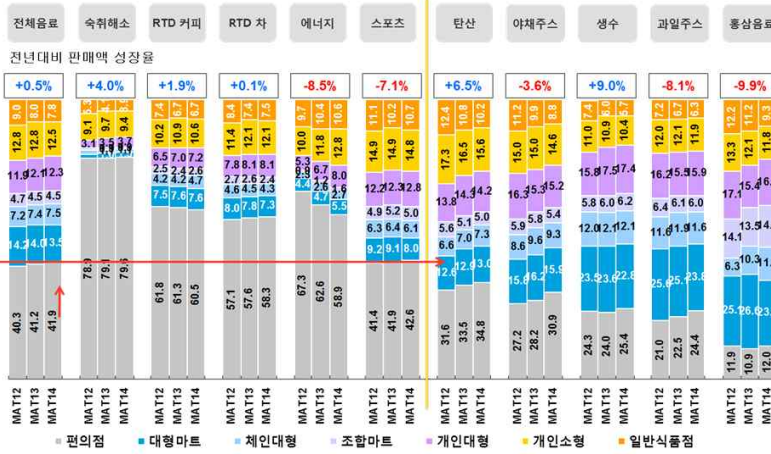
<그림> 품목/기간별 전년비 성장률 추이

[전체 음료] 채널 별 연간 판매액 규모
 기준: 전국, 판매액(백만원), 금액 중요도(%), MAT(1-12월)



<그림> 채널별 연간 판매액 규모

[전체 음료] 카테고리 별 채널 중요도 비교
 기준: 전국, 각 카테고리=100%, 금액 기준 채널중요도(%), MAT(1-12월)



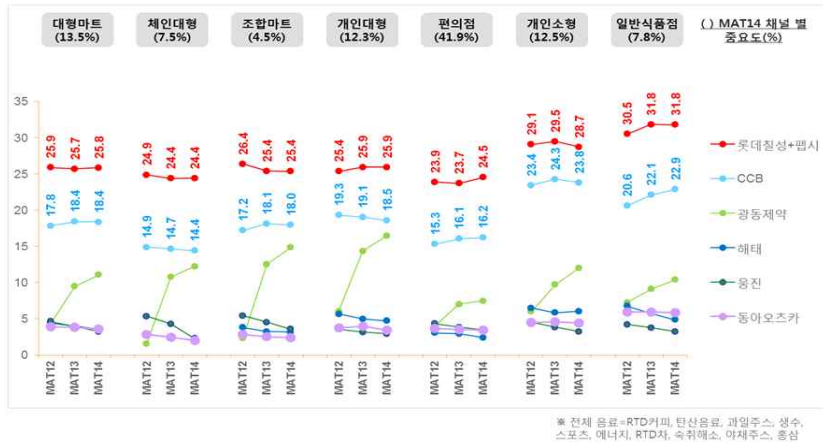
<그림> 음료 카테고리별 채널 중요도 비교

[전체 음료] 주요사 별 연간 판매 성과 비교
 기준: 전국, 판매액 점유율(%), 전체 음료 카테고리=100%, MAT(1-12월)



<그림> 음료 제조사별 연간 판매 성과 비교

[전체음료] 채널 별 제조사 점유율 현황
 기준: 전국, 판매액 점유율(%), 전체 음료 카테고리=100%, MAT(1-12월)



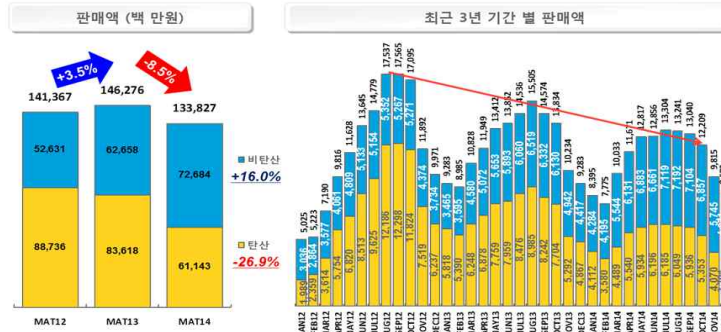
<그림> 채널 별 제조사 점유율 현황

나. 에너지음료 현황 조사

(1) 에너지음료 시장 조사 결과

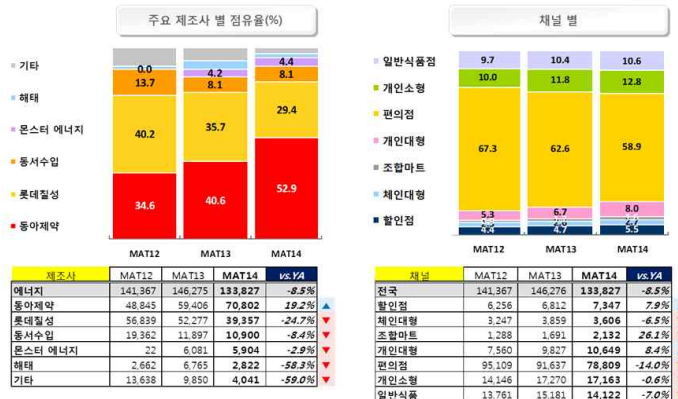
[에너지] 타입 별 연간 판매 추이
 기준: 전국, 판매액 (백만원), 에너지 음료=100%, MAT(1-12월)

KG당 판매 가격(원)	MAT12	MAT13	MAT14	vs. YA
에너지 음료	4,702	4,387	4,701	7.2
탄산	4,275	3,731	3,804	1.9
비탄산	5,653	5,729	5,864	2.3



<그림> 에너지음료 타입별 연간 판매 추이

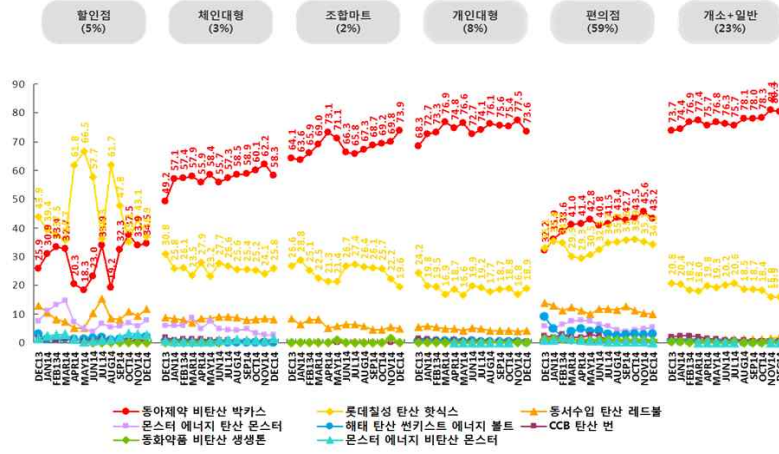
[에너지] 채널 별 제조사 점유율 현황
 기준: 전국, 판매액 점유율(%), 에너지=100%, MAT(1-12월)



<그림> 에너지음료 채널별 제조사 점유율 현황

[에너지] 채널 별 브랜드 점유율 현황

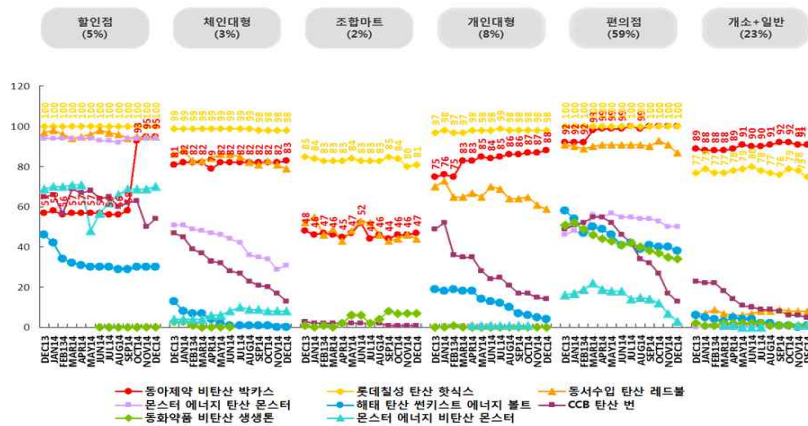
기준: 판매액 점유율(%), 에너지=100%



<그림> 에너지음료 채널별 브랜드 점유율 현황

[에너지] 채널 별 제조사 취급 현황

기준: WD판매취급(%), 에너지=100%



<그림> 에너지음료 채널별 제조사 취급 현황

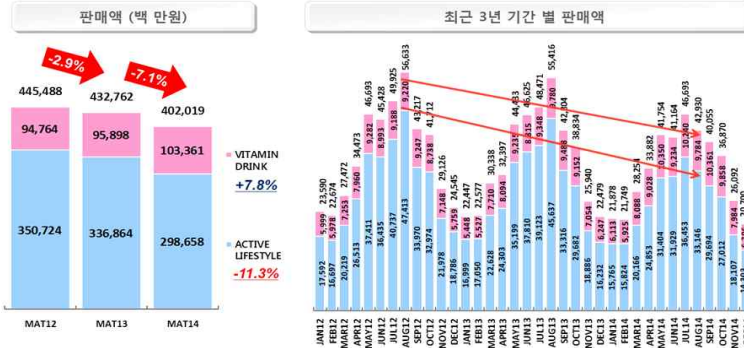
다. 스포츠음료 현황 조사

(1) 스포츠음료 시장 조사 결과

[스포츠] 타입별 연간 판매 추이

기준: 전국, 판매액 (백만원), 스포츠=100%, MAT(1-12월)
 Active Lifestyle : 게트레이, 글라스, 데일리C, 파워에이드, 포카리 스웨트 등
 Vitamin Drink : 비타500, 비타파워 등

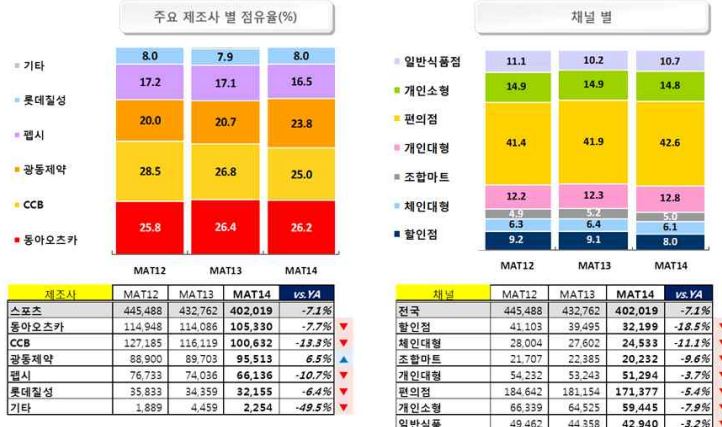
KG당 판매 가격(원)	MAT12	MAT13	MAT14	vs. YA
스포츠 음료	2,544	2,577	2,686	4.2
ACTIVE LIFESTYLE	2,227	2,344	2,290	2.0
VITAMIN DRINK	5,384	5,381	5,375	-0.1



<그림> 스포츠음료 타입별 연간 판매 추이

[스포츠] 채널별 제조사 점유율 현황

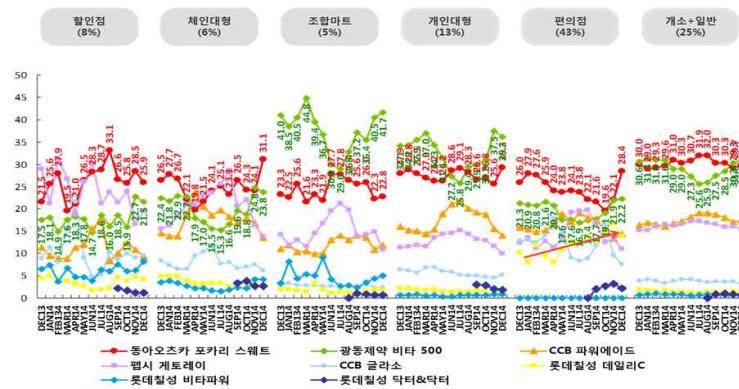
기준: 전국, 판매액 점유율(%), 스포츠=100%, MAT(1-12월)



<그림> 스포츠음료 제조사 점유율 현황

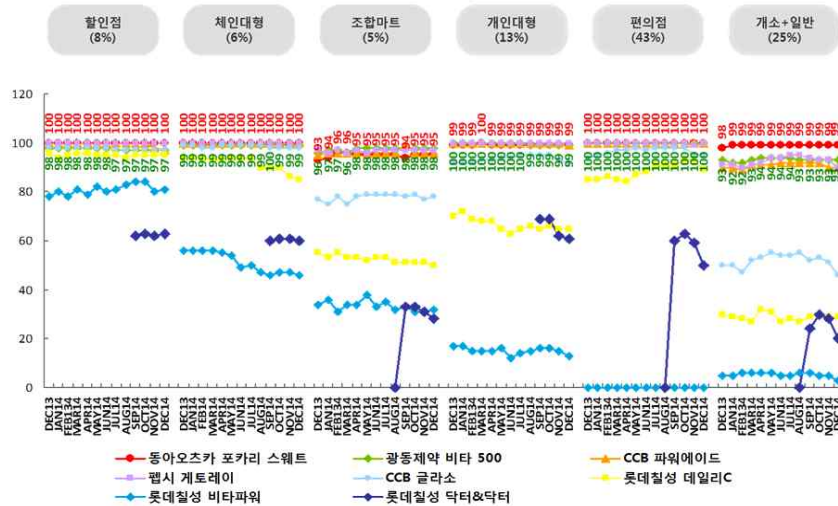
[스포츠] 채널별 제조사 점유율 현황

기준: 판매액 점유율(%), 스포츠=100%



<그림> 스포츠음료 채널별 제조사 점유율 현황

[스포츠] 채널 별 제조사 취급 현황
 기준: WD판매취급(%), 스포츠=100%



<그림> 스포츠음료 채널별 제조사 취급 현황

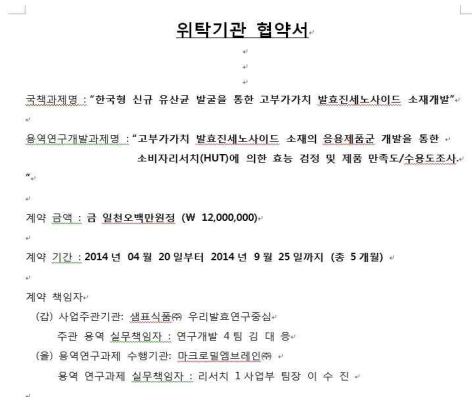
라. 고찰

- (1) 10개 음료군의 2015년 총 판매 규모는 약 4조 3천억 수준.
- (2) 전 카테고리 성장률 둔화되고 있으나 생수, 숙취해소, 피로회복 고 성장세 지속.
- (3) 편의점, 개인대형의 성장세 지속에 따른 대형마트(할인점) 판매 하락.
- (4) 숙취해소, RTD 커피/차, 에너지, 스포츠음료군은 편의점 비중이 40% 이상을 차지하고 있음.
- (5) 에너지음료는 1,340억 규모로 시장 점유율 하락 중.
- (6) 편의점 판매 하락이 주요 요점이며 동아제약을 제외한 주요 브랜드 판매 하락 심화.
- (7) 동아제약 박카스, 롯데 핫식스 점유율 상승, 그 외 브랜드 미미한 수준임.
- (8) 할인점 내 박카스Vs.핫식스 점유율 경쟁 중, 박카스 전 채널 점유율 확대.
- (9) 박카스는 편의점, 개인대형으로 취급 확대, 탄산, 에너지음료 브랜드는 편의점 이탈.
- (10) 전체 스포츠음료 하락은 소비자 active lifestyle에 영향, 비타민음료는 전년 대비 판매상승.
- (11) 전 채널 판매 하락, 특히 할인점 하락 폭 큼, 단, 주요 제조사 중 광동제약은 판매 성장.
- (12) 비타민드링크(포카리스웨트, 비타500) 점유율 상승, 파워에이드, 게토레이는 점유율 하락.
- (13) 편의점 내 포카리스웨트 점유율 반등, 롯데, 데일리C 점유율 확대.
- (14) 스포츠음료는 대부분의 채널에서 안정적으로 취급을 유지하는 편임.

8. 소비자 니즈 및 동향 분석을 위한 캐리어 관련 소비자 기호도/선호도 조사

가. 발효진세노사이드 복합발효물의 기호도/선호도/효능에 대한 HUT 평가

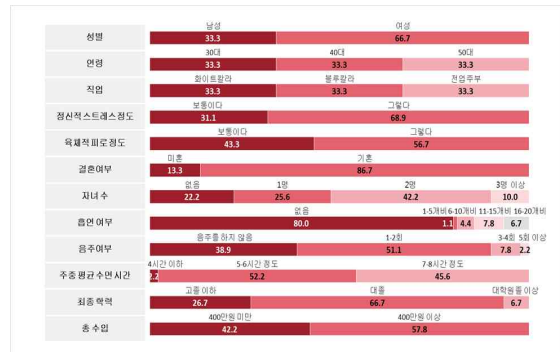
(1) 조사 기관



<그림> 마크로밀엠브레인 주문계약서 사본 및 결과보고서

(2) 조사 설계(패널수 90명, 4주간 음용, 총 3회 설문조사 실시)

조사 목적	본 조사는 생표신규 프로바이오틱스에 대한 기능성 효능 평가를 위해 계획되었음																
조사 방법	HUT (음용 총 4주, 1일 2회 음용)																
조사 대상	<ul style="list-style-type: none"> 만 30~59세 직장인/전업주부 서울/수도권 거주자 정신적 스트레스 또는 육체적 피로 고관여자 최근 6개월 이내 건강요요 음용 경험자 제품 소재(산/유산, 이온도, 칼슘)에 대한 거부사 제외 음료 제품 구매 시, 의사결정경자 																
표본 수	총 90명																
	<table border="1"> <tr> <th>연령</th> <th>30~39세</th> <th>40~49세</th> <th>50~59세</th> </tr> <tr> <td>직장인(비워드관리)</td> <td>10</td> <td>10</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>직장인(블루관리)</td> <td>10</td> <td>10</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>전업주부</td> <td>10</td> <td>10</td> <td>10</td> </tr> </table>	연령	30~39세	40~49세	50~59세	직장인(비워드관리)	10	10	10	직장인(블루관리)	10	10	10	전업주부	10	10	10
연령	30~39세	40~49세	50~59세														
직장인(비워드관리)	10	10	10														
직장인(블루관리)	10	10	10														
전업주부	10	10	10														
조사 기간	<ul style="list-style-type: none"> 2015.05.18 ~ 2015.05.19 (2일간) - 사전조사 2015.06.04 ~ 2015.06.05 (2일간) - 1차 조사 2015.06.18 ~ 2015.06.19 (2일간) - 2차 조사 																



<그림> 조사 개요 및 패널의 특성분석

(3) 조사 프로세스



<그림> 조사 프로세스

(4) 조사 결과 요약

전반적 평가 긍정적, 전반적 효과에 대해서는 4주 응용한 후 효과 체감

속성 중, '차별성'에 대한 긍정 응답율이 가장 높으나, 63.3%가 전반적으로 만족한다고 응답



<그림> 조사결과 요약_전반적 평가

정신적 스트레스 회복 효과 있음, 모든 속성에 대해 응용 전에 비해 개선됨

특히, 4주 응용 후 '깊은 수면', '조금씩 개선', '감정 표현', '스트레스 해결' 등에 대한 긍정 응답율 Gap이 큼



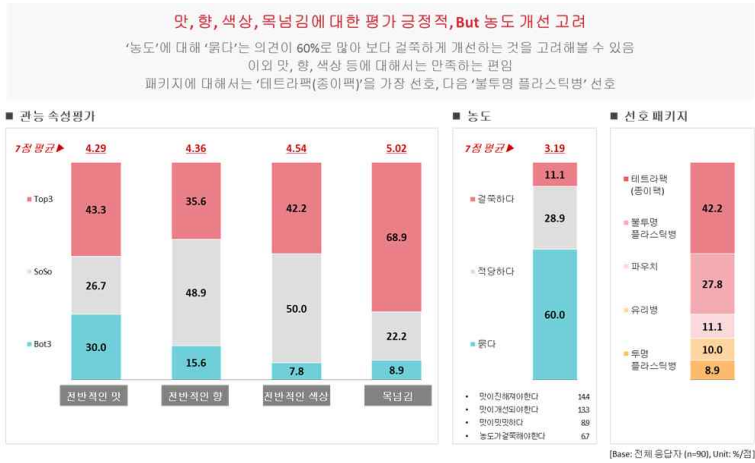
<그림> 조사결과 요약_정신적 스트레스 효능평가

육체적 피로 회복 효과 있음, 대부분의 속성에 대해 응용 전에 비해 개선됨

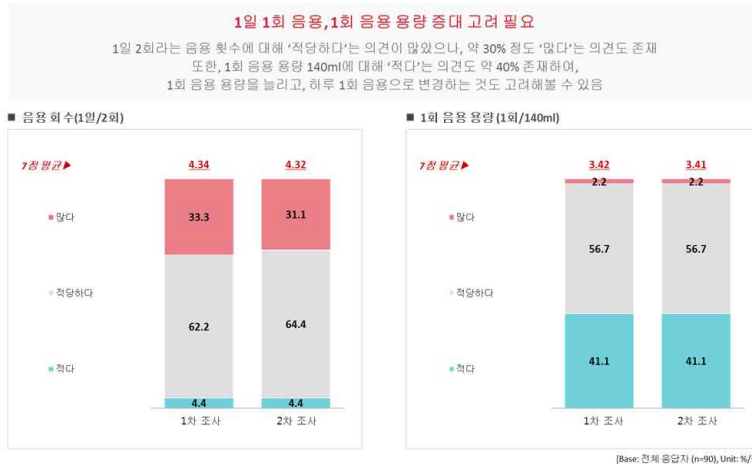
특히, 4주 응용 후 '땀이/어깨통증', '신체활동 후 피로회복', '눈 피로도' 등에 대한 긍정 응답율 Gap이 큼



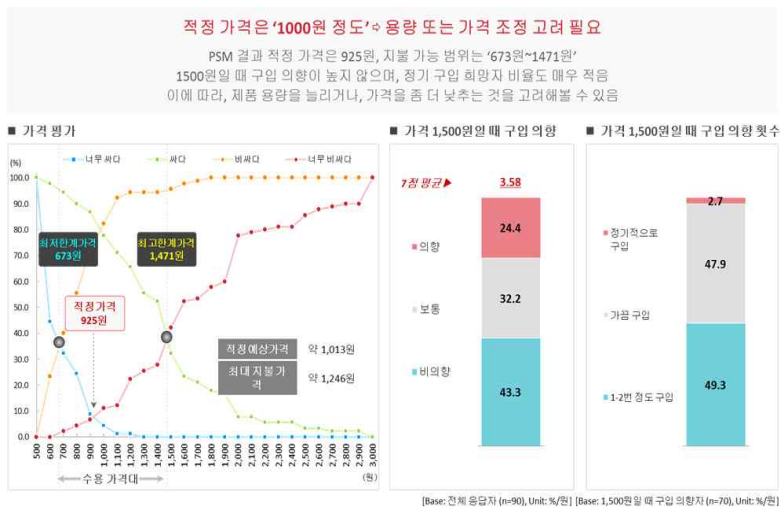
<그림> 조사결과 요약_육체적 피로 효능평가



<그림> 조사결과 요약_관능 속성평가(1)



<그림> 조사결과 요약_관능 속성평가(2)



<그림> 조사결과 요약_가격평가

- ☞ 제품 관능 평가 결과, '목넘김'에 대해 약 68.9%의 응답자가 긍정적인 평가를 하였으며, '맛'은 43.3%, '향'은 35.6%, '색상'은 42.2%가 긍정적으로 평가를 하였음
- ☞ '농도'는 28.9%가 긍정적으로 평가 하였으나, 묽다는 응답이 60.0%로 많았음



<그림> 조사결과 세부_관능속성평가(1)

- ☞ 1회 음용 용량(140ml)은 적당하다는 의견이 56.7%로 높았으나, 적다는 의견 또한 41.1%로 용량을 늘려야 한다는 의견 있었음
- ☞ 1일 2회 음용 횟수 역시 적당하다는 의견이 64.4%로 높았으나, 많다는 의견 또한 31.1%로 횟수를 줄여야 한다는 의견 있었음



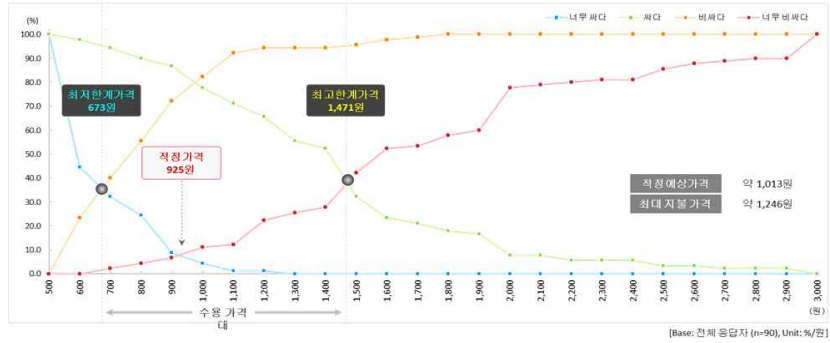
<그림> 조사결과 세부_관능속성평가(2)

- ☞ 선호 패키지 형태는 '테트라팩'이 42.2%로 가장 높았으며, 다음으로 '블투명 플라ستيك병', '파우치' 순으로 응답 되었음



<그림> 조사결과 세부_선호 패키지 조사

- 가격 평가 결과, 수용 가격대는 '673원~1,471원'이었으며, 최적 가격은 925원으로 예상가격(1,500원) 보다 575원 낮게 나타났음
- 적정 예상가격은 약 1,000원 수준이며, 최대 지불 가격은 약 1,200원으로 나타났음



<그림> 조사결과 세부_가격 평가

- 가격 (1,500원) 제시 후 구입 의향은 24.4%로 낮은 수준이며, '보통' 이상의 구입 의향을 보인 응답자의 대부분은 '가끔 구입'(47.9%) 또는 '1~2번 구입'(49.3%)하고 싶은 정도로 나타났음 ('정기적 구입'은 2.7%임)
- 가격 대비 가치 평가 결과, 전체의 33.3%가 긍정적으로 평가하였으며, 31.1%는 '보통'으로 응답하였음

	3.58	3.70	3.40	3.63	3.50	4.03	3.20	3.37	3.68
구입 의향 (가격1,500원)									
* 의향	24.4	33.3	16.7	23.1	26.7	33.3	13.3	20.0	26.7
* 보통	32.2	23.3	25.7	46.7	33.3	33.3	30.0	30.0	33.3
* 비의향	43.3	43.3	56.7	30.0	40.0	33.3	56.7	50.0	40.0
구입 의향 정도 (가격1,500원)									
* 1~2번 정도 구입	49.3	52.0	44.0	52.2	60.9	53.6	31.8	45.5	51.0
* 가끔 구입	47.9	40.0	56.0	47.8	34.8	42.9	68.2	50.0	47.1
* 정기적으로 구입	2.7	8.0	(23*)	(21*)	(22*)	3.6	(20*)	(25*)	(45)
가격 대비 값어치									
* 2이하	3.91	3.97	3.97	3.80	3.90	4.30	3.53	3.83	3.95
* 보통	31.1	36.7	36.7	20.0	26.7	40.0	26.7	33.3	30.0
* 좋음	35.6	33.3	33.3	40.0	43.3	16.7	46.7	40.0	33.3
전체	(90)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(60)
* 화이트라라		(30)							
* 블루라라			(30)						
* 전업 우유				(30)					
* 30대					(30)				
* 40대						(30)			
* 50대							(30)		
* 남성								(30)	
* 여성									(60)

<그림> 조사결과 세부_가격제시 후 구입 의향 조사

- 자사 건강음료 2주 복용 후 개선점은 '맛'에 대한 응답이 많았으며, 특히 '맛이 맛있다', '농도가 더 진해야 한다' 등의 의견이 언급되었으며, '용량이 더 늘어나야 한다'는 의견 또한 21.1%로 많이 언급되었음

• 용량이 더 늘어나야 한다(180ml)	21.1	• 단맛을 줄여야 한다	2.2
• 맛이 진해져야 한다	14.4	• 풍미가 느껴지면 좋겠다	2.2
• 맛이 개선되어야 한다	13.3	• 맛이 기존제품과 차별적이지 않다	2.2
• 가격이 저렴해야 한다	11.1	• 향이 조금 더 진해야 한다	2.2
• 맛이 맛있다	8.9	• 과일향이 첨가되어야 한다	2.2
• 농도가 짙어져야 한다	6.7	• 1일 1회 음용으로 출시되어야 한다	2.2
• 향이 개선되어야 한다	4.4	• 패키지가 유리병이면 좋겠다	2.2
• 기존 제품과의 차별화가 필요하다	4.4	• 스트로우를 사용하지 않고 바로 마실 수 있는 용기면 좋겠다	2.2
• 맛이 고소해야 한다	3.3	• 천연적인 면을 강조해야 한다	2.2
• 용기가 개선되어야 한다	3.3	• 건강한 재료가 첨가되어야 한다	2.2
• 맛이 달콤해야 한다	2.2	• 풍미가 느껴져야 한다	1.1

<그림> 조사결과 세부_개선점 조사

9. 관능 평가에 따른 레시피 및 제품 최적화/자사 또는 전문 OEM을 통한 최종 Prototype 및

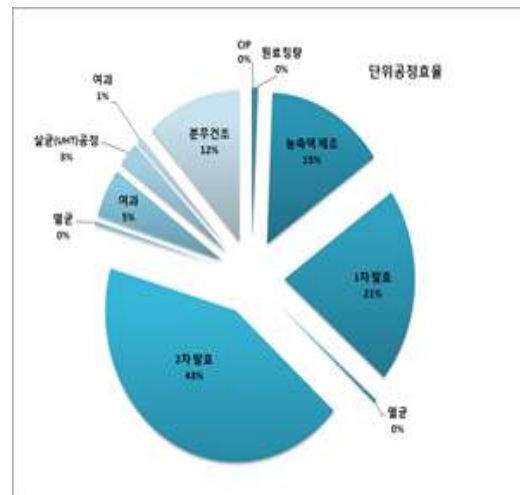
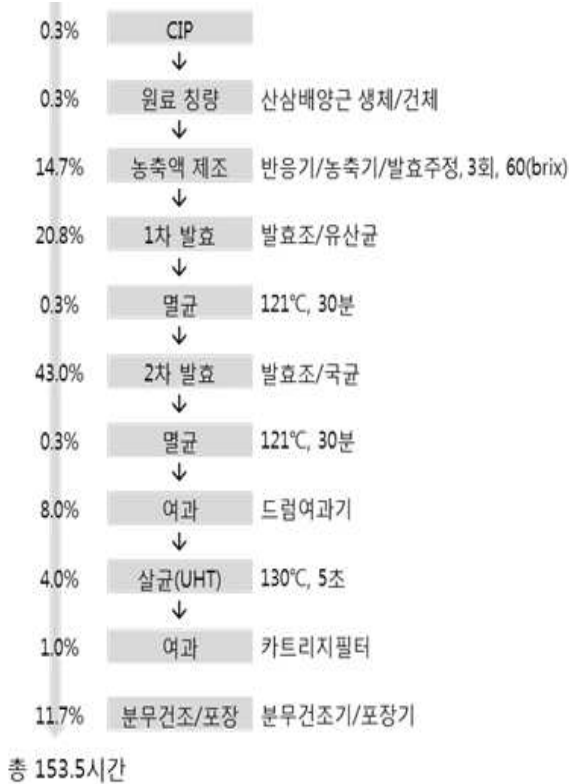
시제품 생산/규격 최적화

가. 발효진세노사이드 복합발효물 최적화

(1) 최적 제조공정도



<그림> 최적 제조공정에 따른 설비



<그림> 최적 제조공정도 및 단위공정수율

(2) 최적 제조공정에 따른 제조지시서(lot.160509)

생프시콜㈜ 우리발효연구소

제조지시서 / 기록서

제품명 : 발효진세노사이드 복합발효물

(국역과제 연구용 최종 Prototype : LOT. 160509)*

제품의 순발효 : 기타가공식품.

제품의 성분 : 알칼리 분말.

- #1. 원료칭량 및 농축액 제조공정.
- #2. 1차 발효 및 멸균공정.
- #3. 2차 발효 및 멸균공정.
- #4. 분리정제 및 제형화공정.
- #5. 원료칭량 기록서.
- #6. 완제품 검사.

제조일자 및 LOT 번호 : 2016년 5월 9일, LOT. 160509.

제품명	제조일자		제조번호		제조장소		제조인원	
	제조일자	제조번호	제조일자	제조번호	제조인원	제조인원	제조인원	제조인원
제품명	2016.05.09	160509	2016.05.09	160509	김민준	김민준	김민준	김민준

#1. 원료칭량 및 농축액 제조공정

제품명	발효진세노사이드 복합발효물 (LOT. 160509)				
제조일자	2016년 5월 9일	제조번호	160509	제조인원	김민준
공정명	원료 칭량 및 혼합		원료 칭량	목적	정량
CIP	1-1. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
	1-2. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
사면	2-1. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
	2-2. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
발효	3-1. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
	3-2. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
농축액	4-1. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
	4-2. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량

#2. 1차 발효 및 멸균공정

제품명	발효진세노사이드 복합발효물 (LOT. 160509)				
제조일자	2016년 5월 9일	제조번호	160509	제조인원	김민준
공정명	원료 칭량 및 혼합		원료 칭량	목적	정량
1차 발효	1-1. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
	1-2. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
멸균	2-1. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
	2-2. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량

#3. 2차 발효 및 멸균공정

제품명	발효진세노사이드 복합발효물 (LOT. 160509)				
제조일자	2016년 5월 9일	제조번호	160509	제조인원	김민준
공정명	원료 칭량 및 혼합		원료 칭량	목적	정량
2차 발효	3-1. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
	3-2. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
멸균	4-1. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
	4-2. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량

#4. 분리정제 및 제형화공정

제품명	발효진세노사이드 복합발효물 (LOT. 160509)				
제조일자	2016년 5월 9일	제조번호	160509	제조인원	김민준
공정명	원료 칭량 및 혼합		원료 칭량	목적	정량
분리정제	1-1. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
	1-2. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
제형화	2-1. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량
	2-2. 건조물(100g) 및 건조물(100g) 혼합물(200g) 제조	100g 건조물, 100g 건조물	200g 혼합물	정량	정량

#5. 원료칭량 기록서

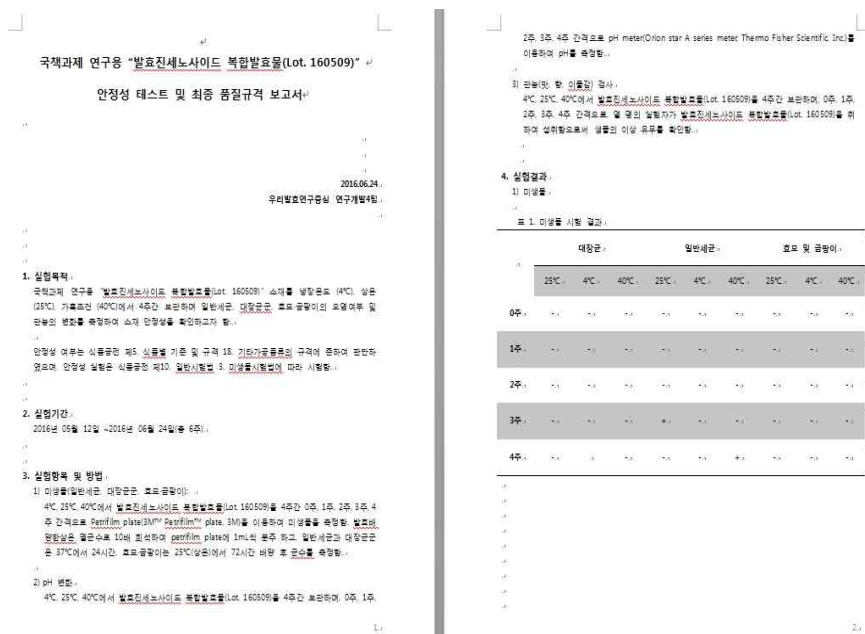
제품명	발효진세노사이드 복합발효물 (LOT. 160509)				
제조일자	2016년 5월 9일	제조번호	160509	제조인원	김민준
원료명	제조	사용량	기존 사용량	일일량	제조인원
산성비정제(MP-CP)	제조	200g	400g	400g	김민준
유산균(A. niger)	제조	22g	22g	22g	김민준
유산균(A. oryzae)	제조	35.5g	35.5g	35.5g	김민준
pH 조절제	제조	0.5g	0.48g	0.48g	김민준
황산(50%)	제조	760g	760g	760g	김민준
염화칼륨(90%)	제조	0.12g	0.12g	0.12g	김민준
특수 배양 시 기록 사항	제조인원	제조인원	제조인원	제조인원	김민준

<그림> 최적 제조공정에 따른 제조지시서(lot.160509)

(3) 발효진세노사이드 복합발효물 최종 품질규격

표 1. 발효진세노사이드 복합발효물 품질규격

항 목	품질 기준	결 과	비 고
성 상	암갈색 분말	적합	
고형분함량(%)	90 이상	적합	
pH	4.5±0.5 (25℃)	적합	
타겟 진세노사이드 (C-K+Rh1+F1)(mg/kg)	300 이상	적합	420mg/kg
중금속(납, ppm)	10 이하	적합	
중금속(비소, ppm)	5 이하	적합	
일반세균(CFU/g)	1×10 ⁴ 이하	적합	
대장균(E.Coli)	음성	적합	



<그림> 발효진세노사이드 복합발효물(lot.160509) 안정성테스트(1)

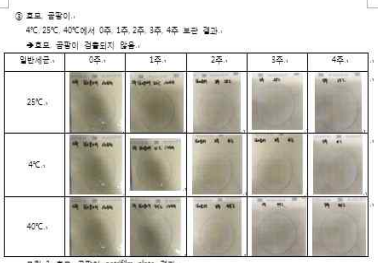
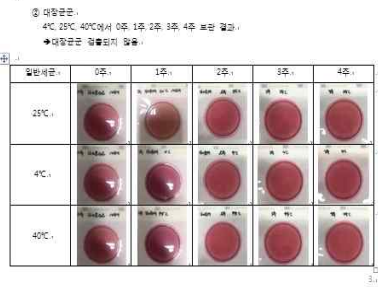
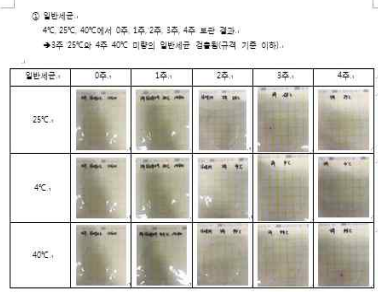


그림 3. 효모, 곰팡이 petrifilm plate 결과

2) pH 변화:
표 2. 보관 일제 따른 시료의 pH변화

	0주	1주	2주	3주	4주
25℃	4.82	4.78	4.87	4.82	4.85
4℃		4.85	4.82	4.78	4.83
40℃		4.86	4.86	4.86	4.86

→ 4주 동안 pH 4.80에서 5.08 유지.

3) 관능검사:
전문 패널을 이용하여 관능 평가를 진행한 결과, 맛, 향, 인공감염, 대항 변화 및 특이사항 없음.

<그림> 발효진세노사이드 복합발효물(lot.160509) 안정성테스트(2)

(4) 고찰

- 발효진세노사이드 복합발효물(Lot. 160509)의 안정성테스트를 위해 미생물 (일반세균, 대장균군, 효모·곰팡이), pH 변화, 관능검사를 실시함.
- 냉장온도 (4 ℃), 실온 (25 ℃), 가혹조건 (40 ℃) 0주, 1주, 2주, 3주, 4주 간격으로 안정성 테스트 실시한 결과, 4주 동안 안정성 문제 없음.
- 4℃, 25℃, 40℃에서 4주 동안 품질 및 안정성에 이상이 없음을 확인하였음.

나. 발효진세노사이드 복합발효물 함유 최종 prototype 타정/캡슐/과립 타입 3종 제작

(1) 타정(정제) 타입 제조



샘플요청서		품종명	생산연도	규격명	대포이사
		개			
일자: 2025년 08월 08일					
1.제출명	발효진세노사이드복합물 시제품	2.신청방법	1회 1정물 출고형에 맞춰		
3.제출수량	가려가량물	4.요청방법	500mg 50정 1봉		
5.규격	500mg 장방형(소)	6.가려지	삼표니콜류		
7.용도	균화제 효물 2mg(100%) 및 소아기피소포용				
8.기타					
[1] 배합비					
원료코드	명	단위	수량	비율(%)	기타규격
	발효진세노사이드복합물(균화제)		40.0000	1.00000000	200mg
	결정셀룰로오스		18.0000	0.45000000	
	유당결정물		40.0000	1.00000000	
	인산염무수		1.0000	0.00250000	
	소형사정인산구아산		1.0000	0.00250000	
			100.0000	2.50000000	
[2] 정제사정					
	명	단위			
	100정/1봉 => 1.00000000				

<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 타정제품 제조공정도 및 레시피



<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 타정제품 라벨



<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 타정제품 사진

(2) 캡셀 타입 제조



샘플요청서		일	출발관리	생산관리	품질관리	대표이사
		월				
		년				
날짜: 2015년 08월 18일						
1. 제품명	발효진세노사이드복합물 시제품	2. 성분명	1일 1정을 물과 함께 섭취			
3. 제품유형	기타가공품	4. 포장량	500mg 30정입 1봉			
5. 도유액	이온 교환 (리질액)	6. 기타사항	샘표식물유			
7. 용도	균형외과 보충 Protype 및 소화기능보충					
8. 기타사항						
[1] 배합비						
원료코드	<일> 용>	비율비 (%)	비중 (g/ml)	가용규격		
	발효진세노사이드복합물(프로시제품)	40.0000	1.6000.000	200mg		
	결정셀룰로오스	25.0000	1.0000.000			
	포도당폴리머	32.0000	1.2800.000			
	이산화규소	1.8000	720.000			
	소화이탈산마그네슘	1.2000	480.000			
		100.0000	40000.000			
[2] 검토사항						
	<일> 용>					
	200mg 1봉 => 1.600g 1봉					

<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 캡셀제품 제조공정도 및 레시피



그림 94. 발효진세노사이드 복합발효물 캡셀제품 라벨



<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 캡셀제품 사진

(3) 과립 타입 제조



샘플요청서		품질관리	생산관리	비중량	대표이사
일자: 2019년 08월 18일					
1.제품명	발효진세노사이드복합물 시제품	2.성분명	1일 1정을 복용하게 함		
3.제품유형	기타가공품	4.포장방법	1.5g 30포 1팩		
5.규격	1.5g 스틱(세팅)	6.거래처	샘플시제품		
7.용도	중성지방 저감 Probiotic 효소기원식용품				
8.기타					
[1] 배합비					
원료코드	<정 품>	비율비(%)	비중	질소 소량	기준규격
	발효진세노사이드복합물(생효식품)	20.0000	16500.000	과립	300mg
	경제포도당	76.4000	63030.000	과립	
	포소카린스테리아	0.3000	247.500		
	이산화규소	1.8000	1485.000		
	스타이린산나트륨	1.5000	1237.500		
		100.0000	82500.000		
[2] 검토사항					
			참 품		
	20포 1팩 => 1,500명 필요/45,000포 이상 필요!				

<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 과립제품 제조공정도 및 레시피



<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 과립제품 라벨



<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 과립제품 사진

(4) 품목제조보고서

QR 코드

발효번호 : MB02-0003-W000-01120-1275

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고일	일명	제출일자
	종소	제출번호
제출소	원료(식품)	제출번호
	소재지	제출번호
제조방법	제조방법	제조방법
	제조방법	제조방법
	제조방법	제조방법
	제조방법	제조방법
	제조방법	제조방법
	제조방법	제조방법
	제조방법	제조방법
	제조방법	제조방법
	제조방법	제조방법

강원도 순천시장 관서

품목번호	제출번호	제출일자	제출번호	제출번호	제출번호
20102000000-0001	MB02-0003-W000-01120-1275	2016년 03월 09일	3596337	3596337	3596337

본 서류는 전자정부 시스템으로 발급된 것으로 식품안전정보포털(www.foodsafety.go.kr)을 확인하실 수 있습니다.

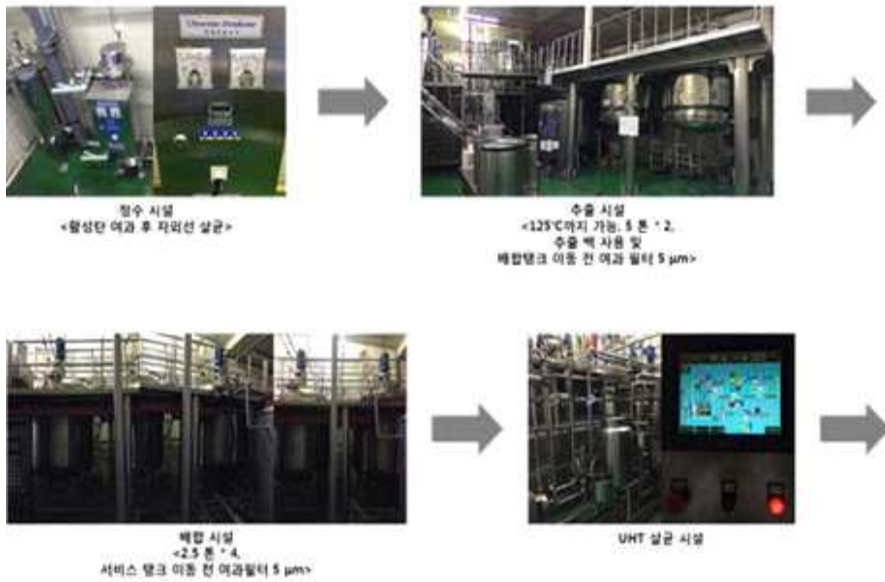
<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 과립제품 품목제조보고서

(5) 고찰

- 타정 제품 유형을 제조할 경우, 첨가물을 최소화하기 위하여 유당만을 부형제로 사용하였으며 기타 합성첨가물은 배제하였음.
- 흡습성이 강한 소재(발효진세노사이드)의 특성으로 인하여 성형 시 고형의 최소화를 위해 가급적 밀봉상태에서 작업을 실시하였음..
- 발효진세노사이드 소재 최적 섭취량을 400mg 기준으로 하여 일일 권장섭취량 200mg/일, 2회 복용 기준으로 장방형 타입의 소형으로 제작 완료하였음.
- 캡슐 제품 유형을 제조할 경우, 첨가물을 최소화하기 위하여 유당과 결정셀룰로오스만을 부형제로 사용하였으며 기타 합성첨가물은 배제하였음.
- 흡습성이 강한 소재(발효진세노사이드)의 특성으로 인하여 성형 시 고형의 최소화를 위해 가급적 밀봉상태에서 작업을 실시하였음..
- 발효진세노사이드 소재 최적 섭취량을 400mg 기준으로 하여 일일 권장섭취량 400mg/일, 1회 복용 기준으로 경질 타입의 0형 적갈색으로 제작 완료하였음.
- 캡슐 제품 유형을 제조할 경우, 첨가물을 최소화하기 위하여 정제 포도당만을 부형제로 사용하였으며 가급적 기타 합성첨가물은 배제하였음.
- 흡습성이 강한 소재(발효진세노사이드)의 특성으로 인하여 과립 성형시 고형의 최소화를 위해 가급적 밀봉상태에서 작업을 실시하였음.
- 발효진세노사이드 소재 최적 섭취량을 400mg 기준으로 하여 일일 권장섭취량 300mg/일, 1회 복용 기준으로 과립 형태의 스틱포로 제작 완료하였음.
(발효진세노사이드 소재의 흡습성으로 인해 20% 이상 배합 이상 발생)

다. 발효진세노사이드 복합발효물 함유 최종 prototype 앰플형 음료 타입 1종 제작
 (1) 음료 타입 제조

주출 및 배합 설비



중진/포장 설비



<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 음료 제품 제조과정

20160720_발효진세노사이드 최종 제품 배합비 (국책과제용)								
원료명	공급업체	원료단가(원)	배합비율(%)	소요량(g)	소요비용(1병당)	총 배합량(g)	총 사용금액(원)	비고
1 발효진세노사이드시계	샘프시계	600,000	0.7	0.14	84	140	84,000	
2 효모발효액	샘프시계	9,000	0.5	0.10	1	100	900	
3 미량아미노산	샘프시계	60,000	1.7	0.34	20	340	20,400	
4 효모	샘프시계	1,872	0.55	0.11	0	110	206	
5 원미발효액	샘프시계	2,000	7.14	1.43	3	1428	2,856	
6 감초농축액	MSC	9,000	2	0.40	4	400	3,600	
7 발효발효액	하니글로벌농업	4,000	10	2.00	8	2000	8,000	
8 생강농축액	MSC	12,500	0.9	0.18	2	180	2,250	
9 정제수		-	76.51	15.30	-	15302	-	
총합			100	20.00	122	20000	122,212	

<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 음료 제품 레시피



<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 음료 제품 레시피



<그림> 발효진세노사이드 복합발효물 음료 제품 사진

(2) 고찰

- 사내패널테스트를 대비하여 “발효진세노사이드복합물” 시제품의 안정성테스트를 실시, 항목으로 미생물 검사, pH 측정, 관능검사를 실시함.
- 4℃, 상온, 40℃ 에서 15일간 보관, 지속적으로 안정성 테스트 실시한 결과, 미생물 (일반세균, 대장균, 효모, 진균), pH, 관능 등, 시제품에 대한 안정성 문제 없음.
- 가혹 조건인 40℃에서 30일 간 품질 및 안정성에 이상이 없으므로 일반적으로 상온하에서 유통기한 설정 실험법에 의거하여 최소 6개월 이상 유통이 가능한 것으로 사내패널 테스트용에 대한 시제품으로 적절하다고 판단됨.
- 최종 시제품에서의 침전물의 경우, 펩타이드 및 현미발효물에서 발생하는 불용성 물질에 의한 것으로 발효진세노사이드 소재 자체가 불용성이기 때문에 추 후 입자에 의한 나노분쇄 또는 분산공정으로 통하여 좀 더 안정화 시킬 수 있을 것으로 판단됨.
- 특히, 이번 앰플 시제품의 경우, 산삼배양근 생체를 투입함으로써 소비자 기호도를 증가시키고자 하였음. 실제 배합 전 배합액에 관능 상 큰 영향은 없는 것으로 판단됨.

제 6절. 한국형 미생물을 활용한 전통약재 복합 발효 추출물 개발

1. 고기능성 혼합 농축액의 개발

① 농축액 제조

각각의 원료(홍삼, 오가피, 음나무, 황칠)를 스팀을 열원으로 하는 500 L 추출탱크에 넣고 원료 대비 8배수의 정제수를 투입하여 온도 85 °C에서 8시간 동안 2회 추출하였다. 추출액을 카트리리지 필터(5 μ m Cartridge filter)를 이용하여 여과하고 여과한 추출시료를 감압농축기로 이동시켜 온도 60 °C에서 감압(800~850 mm/Hg)하여 60 Brix까지 농축하였다. 혼합농축액은 홍삼농축액 25 %, 오가피농축액 25 %, 음나무농축액 25 %, 황칠농축액 25 %을 혼합하였다.

② 발효농축액 제조

발효농축액 제조는 농축액에 정제수를 가하여 10 Brix로 조정하고 121 °C에서 20분간 멸균·냉각시킨 후 유산균을 1/20 수준으로 첨가하고 37 °C를 유지하면서 incubator에서 72시간 동안 1차 발효를 수행하였다. 1차 발효 후 발효능을 배가 시키기 위하여 2차 발효를 실시하였다. 2차 발효는 미생물 유래 상업 효소를 이용하였으며, 이는 비전 바이오캠사의 Multifect-X를 사용하였다. Multifect-X를 1.5/100 수준으로 접종 후 55 °C shaking incubator에서 15시간 동안 2차 발효 시킨 후, Autoclave를 이용하여 최종 살균 하였다. 살균된 발효액을 온도 60 °C에서 감압농축기(800~850 mm/Hg)를 사용하여 60 Brix까지 농축하였다.

(가) 성분분석

① 조사포닌 함량

조사포닌 함량은 Namba과 Ando 등의 수포화 *n*-butanol 추출법에 준하여 측정하였다. 각각의 농축액 5 g을 둥근 플라스크에 취하고 80 % methanol 100 mL를 가하여 80 °C water bath 상에서 2시간씩 4회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 다음, 여과액을 감압농축하고 60 mL의 증류수에 용해하여 분액깔때기에 넣고 diethyl ether를 첨가하여 지용성 성분들을 제거하였다. 남은 수층에는 수포화 *n*-butanol을 50 mL씩 3회 가하여 *n*-butanol 층으로 이행된 saponin을 분리 농축

시켜 조사포닌 함량으로 하였다.

두릅나무과 홍삼, 오가피, 음나무, 황칠, 혼합물의 추출물 중 조사포닌을 확인한 결과 Table 5에 나타냈다. 발효전의 조사포닌 함량은 음나무>오가피>홍삼>황칠 순이며 발효 후에는 음나무>홍삼>오가피>황칠 순이었다. 특히 음나무는 발효전보다 발효 후에 조사포닌 함량이 약 1.38배 증가하는 결과를 볼 수 있었다.

표. Crude saponin 함량 (wet, mg/g)

	PG	AP	KP	DP	MP
Before Fermentation	72.2	83.2	99.4	62.7	86.2
After Fermentation	66.5	56.1	137.2	49.3	84.7

PG: *Panax ginseng* extract, AP: *Acanthopanax sessiliflorus* extract, KP: *Kalopanax pictus* extract, DP: *Dendropanax morbifera* extract, MP: Mixed extract.

② Ginsenoside 분석

농축액 시료 각 1 g에 80 % 메탄올 20 mL 넣어 80 °C에서 2시간씩 3번 추출한 다음 여과지를 사용하여 여과한 후 모두 혼합하여 감압농축기로 농축하였다. 이를 동량의 증류수에 용해한 후 수포화 BuOH 을 첨가하여 인삼사포닌을 추출하였다. 총 3회 반복 추출 하여 이를 감압농축기를 이용하여 다시 농축, 건조한 후에 10 mL 메탄올에 용해시키고 0.45 μ m membrane filter로 여과한 다음 HPLC(Agilent 1260, USA)를 이용하여 진세노사이드 함량을 분석하였다. 칼럼은 C18(50×4.6 mm, 2.6 μ m), 검출기는 UV detector, 203 nm에서 측정하였으며, 이동상으로는 증류수(A)과 acetonitrile(B)의 gradient system을 사용하였으며 gradient는 0-7, 7-11, 11-14, 14-25, 25-28, 28-30, 30-31.5, 31.5-34, 34-34.5, 34.5-40 분마다 80.0-20.0, 71.0-29.0, 71.0-29.0, 60.0-40.0, 44.0-56.0, 30.0-70.0, 10.0-90.0, 10.0-90.0, 81.0-19.0, 81.0-19.0와 같이 조절하였고 이동상의 유속은 1.0 mL/min이었으며 시료 주입량은 5 μ L, 분석 온도는 45 °C로 하였다.

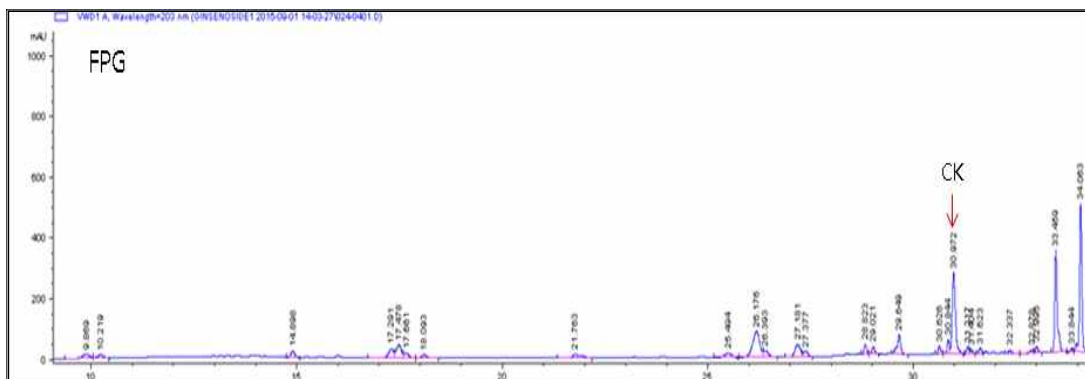
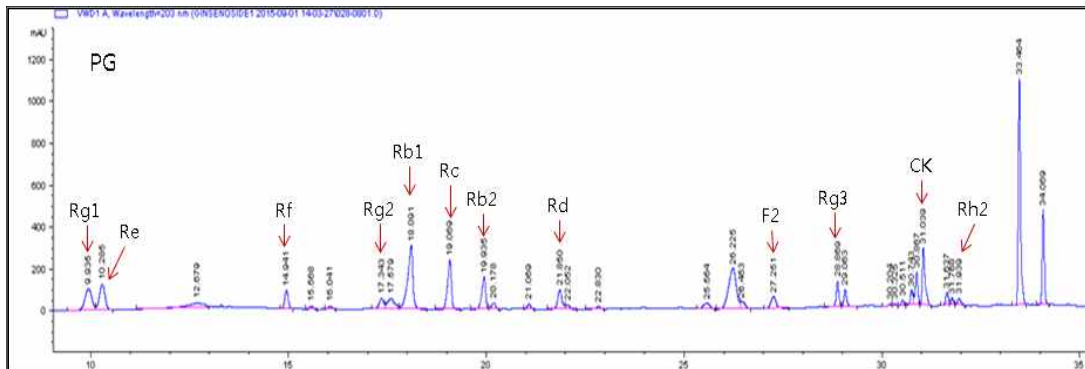
표. HPLC 분석 조건

Analysis Instruments	Agilent 1260		
Column	Kinetex X 2.6 μm C18 100A		
Flux	0.5 mL/min	Dose	5 μL
Injection concentration	Ginsenoside 1 mg/ 60 mL in 80 % methanol		
Detection	UV, 203 nm	Column temperature	45 °C
Mobile phase	H ₂ O : ACN = 80 : 20 ~ 10 : 90 gradient		

표. 발효 전 후의 ginsenoside 함량 비교 (wet, mg/g)

	Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	Rd	F2	rg3	c-k	Rh2
PG	2.12	3.11	0.80	0.61	5.93	4.13	2.12	1.21	1.11	0.68	0.69	0.04
FPG	0.41	0.40	0.22	0.43	0.32	0.30	0.08	0.32	0.80	0.65	1.41	0.14

PG: *Panax ginseng* extract, FPG: Fermented *Panax ginseng* extract.



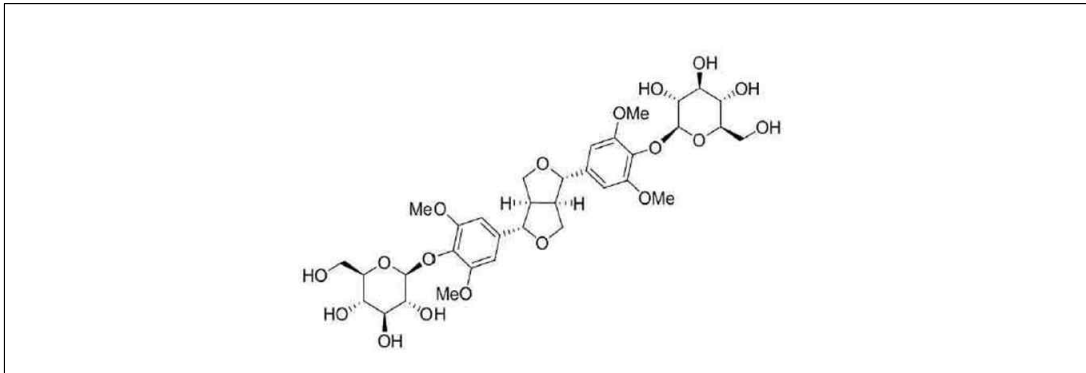
<그림> 발효 전 후의 HPLC profile 분석

PG: *Panax ginseng* extract, FPG: Fermented *Panax ginseng* extract.

2차 발효 과정을 통하여 발효 전 홍삼농축액의 Major ginsenoside Rb1, Rg1, Re, Rc 등의 함량이 많이 줄어들어든 것을 확인할 수 있었으며, 특히 약리 성분이 뛰어난 대표적 2차 대사산물 Compound-K의 함량이 발효전에는 0.69 mg/g에서 발효후 1.4 mg/g으로 다량 생산된 것을 확인할 수 있었다. saponin pathway 확인 결과 발효 대사 과정에서 생성된 것으로, Rb1 → Rd → F₂ 를 거쳐 C-K가 생성된 것으로 확인 되었다(Sung, 1995).

③ Acanthoside D 분석

농축액 시료 2 g을 정밀히 달아 50 mL 부피 플라스크에 취한다. HPLC용 메탄올로 완전히 용해한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC를 이용하여 Acanthoside D을 분석하였다. Acanthoside D 표준품은 식품의약품안전처 생약연구과에서 분양받았으며, 생약 지표성분 표준품 규격서에 준한 분석방법에 의하여 기기분석을 하였다.



<그림> acanthoside D의 구조식

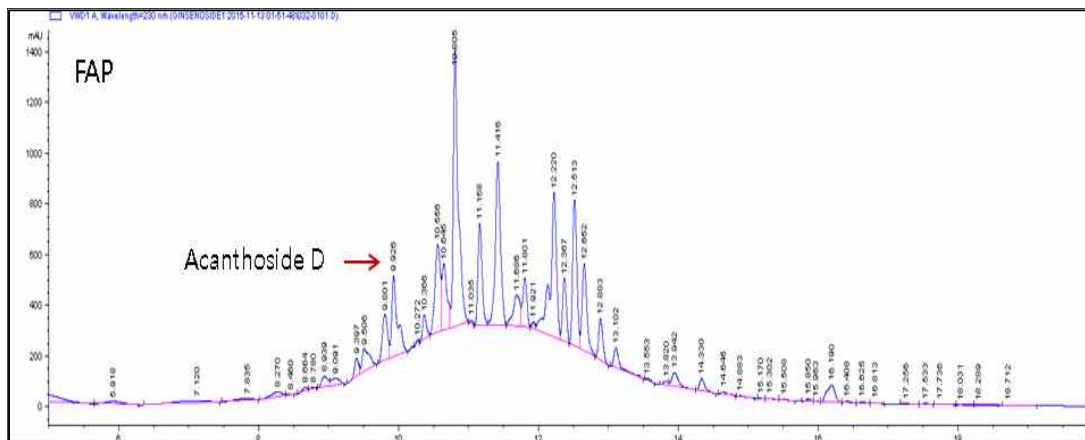
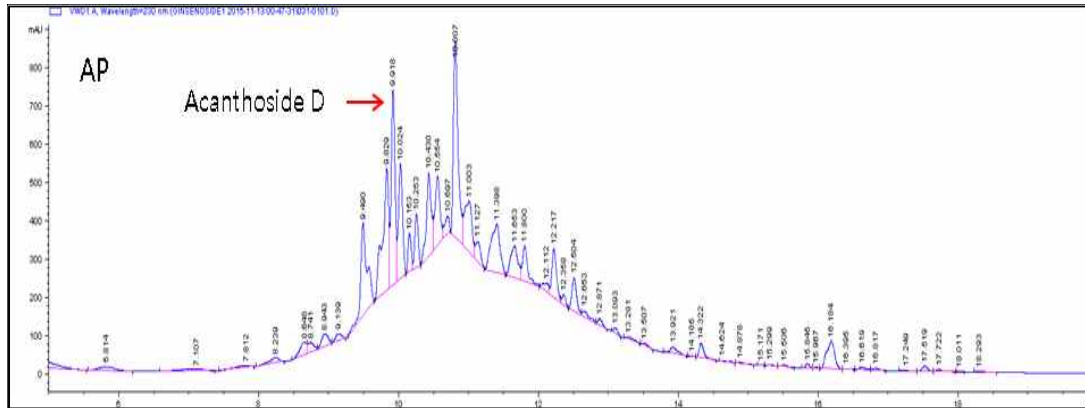
표. acanthoside D의 HPLC 분석 조건

Analysis Instruments	Agilent 1260 series		
Column	Phenomenex C18 (4.6 × 250 mm) 5 μm		
Flux	1.0 mL/min	Dose	10 μL
Injection concentration	Acanthoside D 1 mg/10 mL in 75 % ethanol		
Detection	UV, 230 nm	Column temperature	25 °C
Mobile phase	Mobile phase A - H ₂ O Mobile phase B - ACN		

표. 발효 전 후의 acanthoside D 함량 비교

(mg/g)	Acanthoside D
AP	0.54
MAP	0.49

AP: *Acanthopanax sessiliflorus* extract, FAP: Fermented *Acanthopanax sessiliflorus* extract.



<그림> 발효 전 후 *Acanthopanax sessiliflorus* extract의 HPLC profile 분석

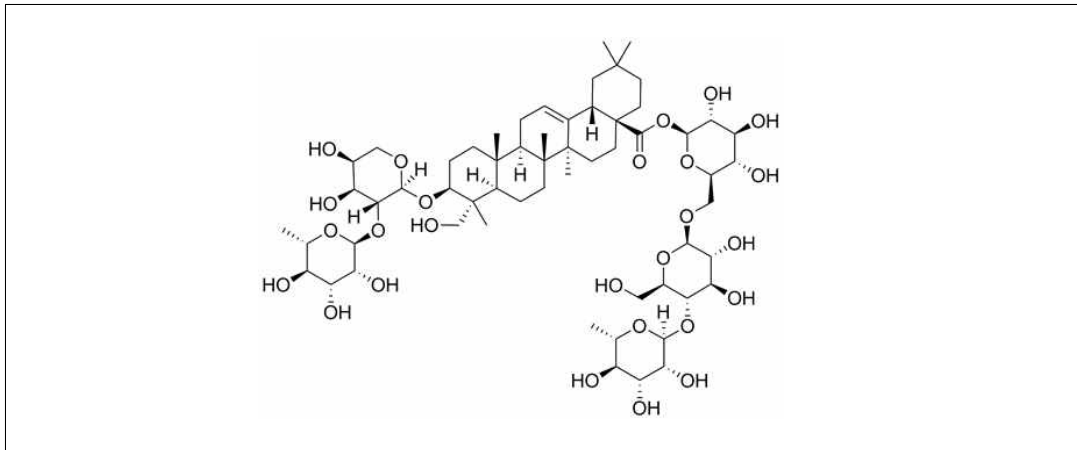
AP: *Acanthopanax sessiliflorus* extract, FAP: Fermented *Acanthopanax sessiliflorus* extract.

Acanthoside D와 Eleutheroside B는 *Acanthopanax* sp.의 특이적인 성분으로 알려져 있어 오가피의 지표성분으로 선정이 가능하나, Eleutheroside B는 뿌리껍질에서의 함량(평균 0.03 %)이 매우 낮고 줄기껍질(평균 0.14 %)에만 집중되어 있으므로 오가피 약용부위에 전반적으로 함유되어 있는 Acanthoside D가 지표성분으로 더 적합할 것으로 사료된다(Lee, 2003).

발효과정을 통해 오가피 농축액의 지표성분인 Acanthoside D의 함량이 발효전 0.54 mg/g에서 발효후 0.49 mg/g으로 변화를 확인 할 수 있었다.

④ Kalopanaxsaponin B 분석

농축액 시료 2 g을 정밀히 달아 50 mL 부피 플라스크에 취한다. HPLC용 메탄올로 완전히 용해한 후 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC를 이용하여 Kalopanaxsaponin B을 분석하였다. Kalopanaxsaponin B 표준품은 식품의약품안전처 생약연구과에서 분양받았으며, 생약 지표성분 표준품 규격서에 준한 분석방법에 의하여 기기분석을 하였다.



<그림> kalopanaxsaponin B 구조식

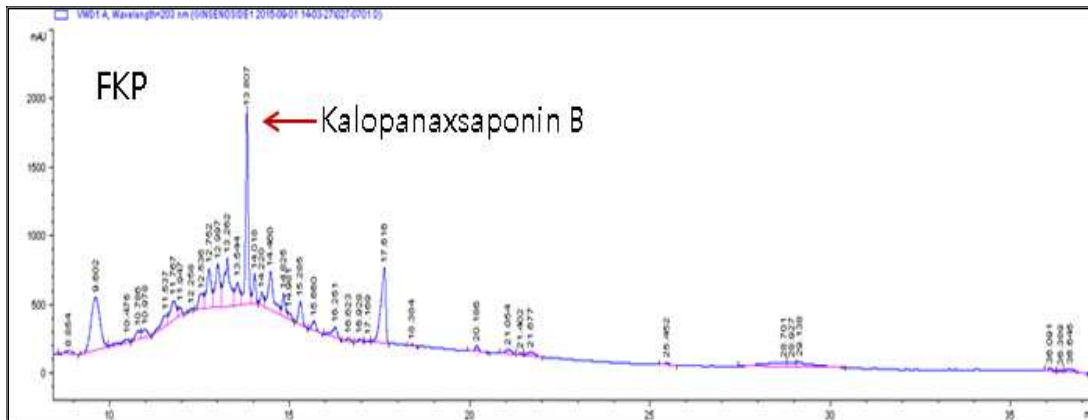
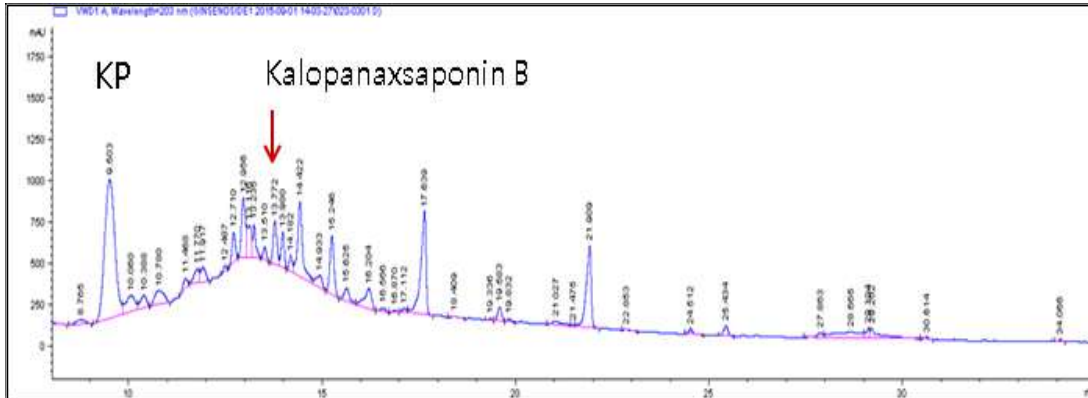
표. akalopanaxsaponin B의 HPLC 분석 조건

Analysis Instruments	Agilent 1260 series		
Column	Waters XBridge C18 (4.6 × 250 mm) 5 μ m		
Flux	1.0 mL/min	Dose	10 μ L
Injection concentration	Kalopanaxsaponin B 1 mg/10 mL in methanol		
Detection	UV, 210 nm	Column temperature	25 $^{\circ}$ C
Mobile phase	10 mM NaH ₂ PO ₄ in H ₂ O : ACN = 75 : 25		

표. 발효 전 후의 *Kalopanax pictus* extract 함량 비교

(mg/g)	Kalopanaxsaponin B
KP	8.70
MKP	2.59

KP: *Kalopanax pictus* extract, FKP: Fermented *Kalopanax pictus* extract.

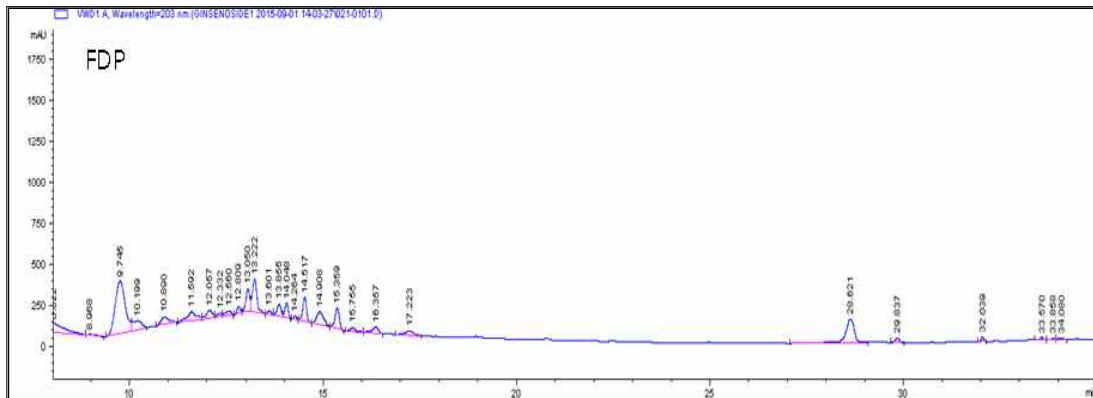
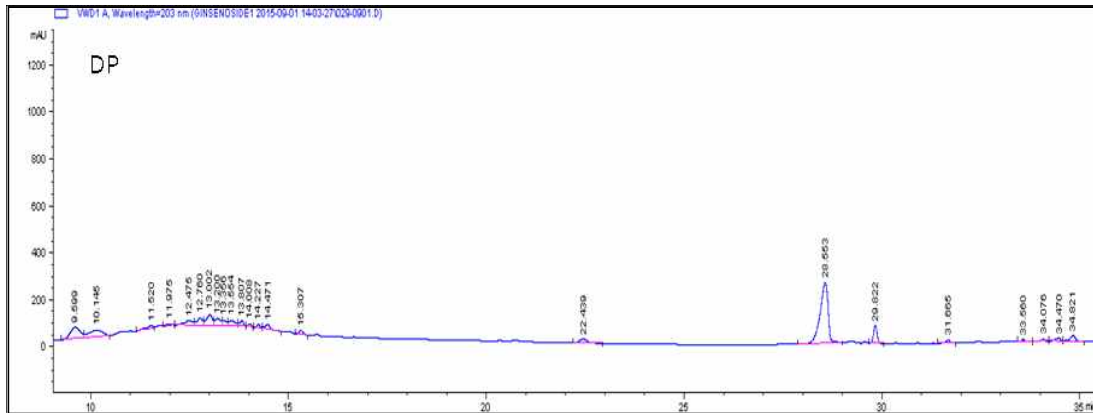


<그림> 발효 전 후 kalopanaxsaponin B의 HPLC profile 분석

KP: *Kalopanax pictus* extract, FKP: Fermented *Kalopanax pictus* extract.

음나무의 saponin 성분인 Kalopanaxsaponin B를 지표물질로 선정하고 함량 변화를 측정하였다(Hong, 2002). 발효과정을 통해 음나무 농축액의 지표성분인 Kalopanaxsaponin B의 함량이 발효전 8.70 mg/g에서 발효후 2.57 mg/g으로 감소 변화를 확인할 수 있었다.

⑤ 황칠 분석

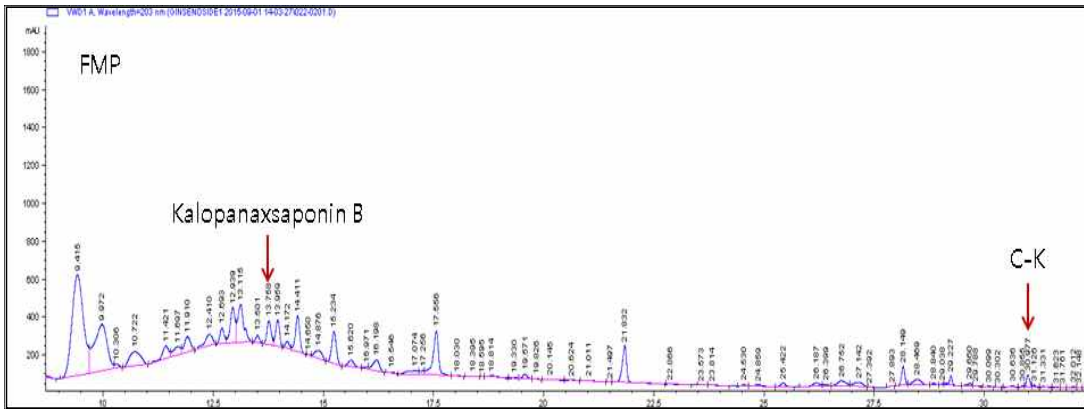
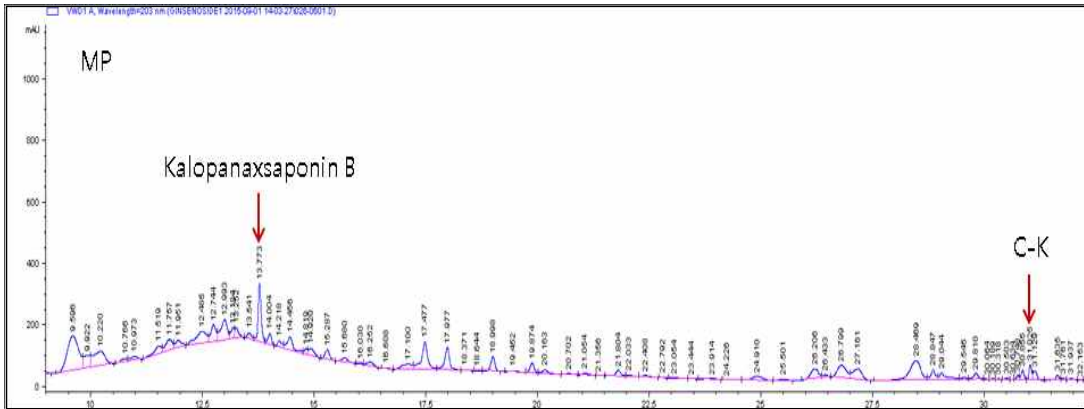


<그림> 발효 전 후 *Dendropanax morbifera* extract의 HPLC profile 분석

DP: *Dendropanax morbifera* extract, FDP: Fermented *Dendropanax morbifera* extract.

황칠에는 다양한 성분들이 분석 보고되고 있으나 현재까지 공인된 지표물질 설정이 되어있지 않아 HPLC를 통한 분석 피크 변화를 통해 발효 유무 확인을 하였다. Fig. 에서 보는 것과 같이 황칠농축액 발효전과 발효후의 HPLC 분석치 변화를 확인 할 수 있었다.

⑥ 혼합물 분석



<그림> 발효 전 후 혼합물의 ginsenosides and acanthoside D, kalopanaxsaponin B.
 MP: Mix extract, FMP: Fermented mixed extract.

발효전 혼합 농축액과 발효후 혼합 농축액에서 시료 각각의 지표성분 변화를 통해 발효과정이 진행된 것을 확인하였으며, 각각의 단일 농축액으로 발효한 결과와 유사하게 지표성분 변화를 확인할 수 있었다.

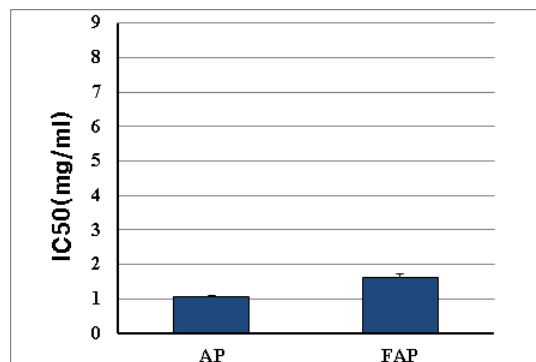
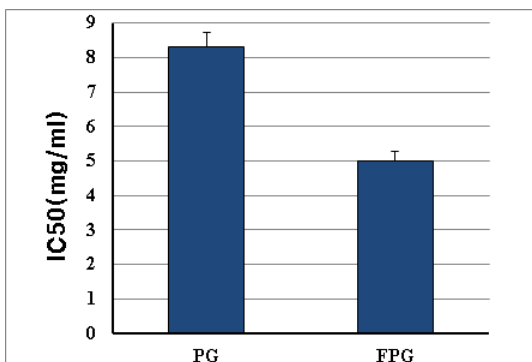
(나) 효능 분석

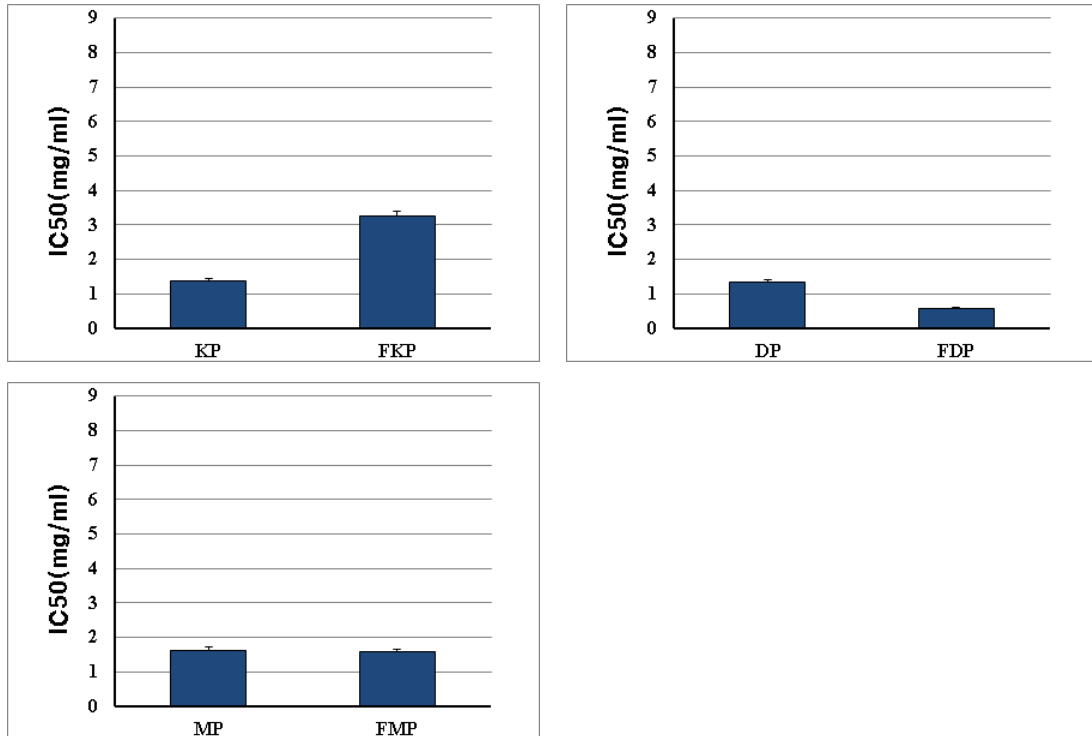
① DPPH radical 소거능 측정

항산화 활성은 어떤 성분이나 물질 등이 산화 분해를 억제하는 능력을 말하며, 항산화 활성을 측정하는 방법으로 DPPH법을 사용하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 Blois 방법에 의해 측정하였다. 이 방법은 원래 천연에 있는 수소공여체(H-donor)를 측정하기 위해 고안되었으나, 이후 페놀성 물질이나 식품의 free radical 소거활성을 측정하는데 사용되었다. 또한, 이 방법은 안정한 자유 라디칼인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)이 수소공여체(H-donor)와 반응하는 능력을 원리로 하여 측정하는 것으로, DPPH는 가시광선 영역에서 매우 강한 흡수를 보여주기 때문에 UV-Vis 분광광도계로 측정할 수 있어 항산화 활성측정에 일반적으로 광범위하게 이용되어진다.

추출된 각 시료는 일정한 농도로 희석한 후 96 well plate에서 시료 20 μ L에 0.2 mM DPPH용액 180 μ L를 혼합한 후 암조건 하에서 30분간 반응한 후 ELISA reader (BioTec, USA)를 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 무첨가군과 첨가군의 값을 비교하여 라디칼 소거능(%)을 다음과 같은 계산식에 의해 계산한 후 각 시료별 라디칼 소거능에 대한 검량선에서 라디칼 소거능이 50%가 되는 농도인 IC₅₀로(Inhibitory Concentration) 환산하였다. 양성 대조약물로는 ascorbic acid를 농도별로 조제하여 사용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \frac{1 - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \times 100$$





<그림>DPPH radical scavenging activity.

PG: *Panax ginseng* extract, FPG: Fermented *Panax ginseng* extract, AP: *Acanthopanax sessiliflorus* extract, FAP: Fermented *Acanthopanax sessiliflorus* extract, KP: *Kalopanax pictus* extract, FKP: Fermented *Kalopanax pictus* extract, DP: *Dendropanax morbiifera* extract, FDP: Fermented *Dendropanax morbiifera* extract, MP: Mixed extract, FMP: Fermented mixed extract.

발효전 농축액과 발효후 농축액을 일정량 희석하여 항산화활성을 비교하였으며, 대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다. 원료 중 황칠 농축액이 항산화활성이 좋았으며, 발효과정을 거친 발효후 황칠농축액이 발효전 보다 항산화활성이 더욱 좋아진 것을 확인할 수 있었다. 발효전의 농축액에서는 오가피와 황칠, 음나무 순으로 항산화활성이 좋았으며, 발효과정을 거친 농축액에서는 황칠, 오가피, 혼합물 순으로 항산화활성이 좋은 것을 확인할 수 있었다. 원료마다 발효를 통한 항산화활성 증대가 차이가 있었으며 황칠의 경우가 발효를 통한 항산화활성 증대 효과를 볼 수 있었다.

② 세포독성 측정(MTT assay)

각 농축액 시료에 대한 세포독성은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherland)방법으로 측정하였다. 96 well plate에 well당 RAW264.7, A549, B16, 3T3-L1세포별로 접종하여 5 % CO₂, 37 °C에서 24시간 배양 후, 각 시료 별로 다시 접종하여 48시간 배양

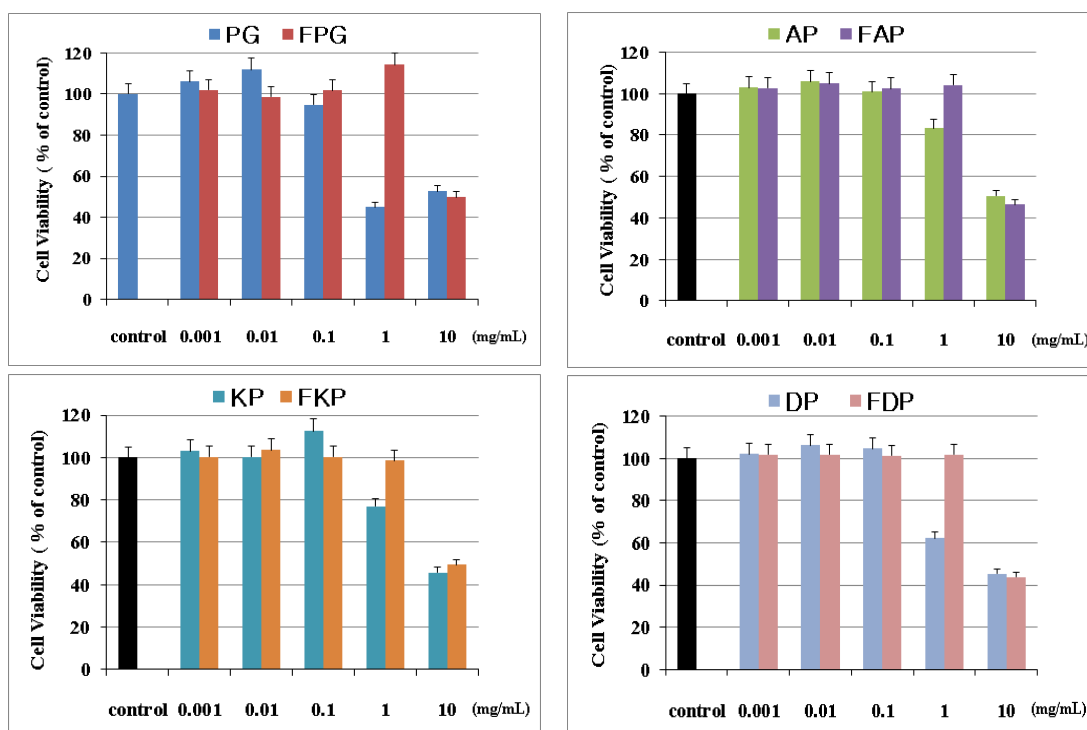
하였다. 이후 5 mg/ml 의 MTT 시약을 이용하여 10 μ L씩을 각 well에 가하여 5 % CO₂, 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 4시간 동안 정치하였다. MTT 용액을 완전히 제거하여 배양 plate를 건조한 후 100 uL dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma -Aldrich, USA)로 세포 내에 형성된 formazan crystal이 보라색으로 발색되면 용해하여 ELISA plate reader (BioTec, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성비율은 정상세포와 추출물을 처리한 군의 비율로 계산하였다.

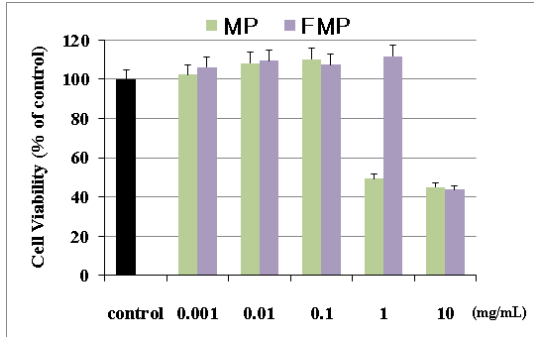
$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}} \times 100$$

③ 항염 활성 측정

RAW 264.7 macrophage cell 배양

실험에 사용한 대식세포주인 RAW 264.7 cell은 한국세포주은행 (KTCC, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. RAW264.7 세포는 10 % FBS(Fetal bovine serum)를 함유한 DMEM(Dulbecco' s modified Eagle' s medium)에 (10 % FBS, 100 U/mL penicillin 및 100 ug/mL streptomycin)을 첨가한 배지를 이용하여 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다.





<그림> 세포독성 RAW264.7 cells

10 sample(PG, FPG, AP, FAP, KP, FKP, DP, FDP, MP, FMP) on cell viability respectively. In the cell viability assay, RAW264.7 cells were incubated for 48 h with various concentrations of samples. Cell viability was determined, as described in the materials and methods.

PG: *Panax ginseng* extract, FPG: Fermented *Panax ginseng* extract, AP: *Acanthopanax sessiliflorus* extract, FAP: Fermented *Acanthopanax sessiliflorus* extract, KP: *Kalopanax pictus* extract, FKP: Fermented *Kalopanax pictus* extract, DP: *Dendropanax morbifera* extract, FDP: Fermented *Dendropanax morbifera* extract, MP: Mixed extract, FMP: Fermented mixed extract.

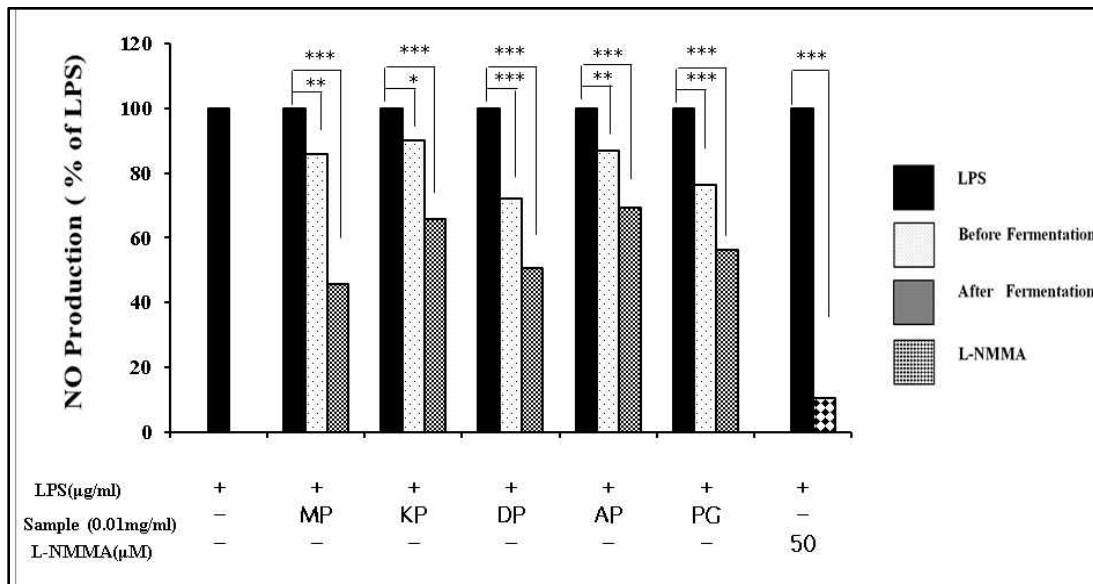
10종의 extract(홍삼, 오가피, 음나무, 황칠, 혼합물, 발효홍삼, 발효오가피, 발효음나무, 발효황칠, 혼합발효물)가 대식세포에 영향을 줄 수 있는 최소농도를 검증하기 위하여 세포독성을 나타내는지에 관한 선행연구로 RAW 264.7 cell에서 48시간 동안 처리한 후 이들 엑스가 세포에 미치는 cell viability에 관한 영향을 측정하였다. 대식세포인 RAW 264.7 세포를 사용하여 10종 엑스를 농도별로 대식세포에 처리한 후, MTT assay 방법으로 세포 생존율로서 세포독성 유무를 확인하였다.

그 결과 발효전 농축액과 발효후 농축액 모두 0.01 mg/mL에서 80 %이상의 유의적인 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 0.01 mg/mL 농도에서 항염증효과 확인시험을 진행하더라도 세포독성에서 기인한 억제효과는 나타나지 않을 것으로 판단하였다. 그러나 1 mg/mL에서 발효 농축액이 발효전 농축액보다 세포독성이 낮다는 것을 특이적으로 확인할 수 있었으며, 10 mg/mL에서 모두 세포독성을 나타내었다.

* Nitric Oxide (NO) 생성량 측정

RAW 264.7 세포에 대하여 DMEM 배지를 이용하여 1×10^5 cells/ml로 조절한 후 96 well plate에 접종하고, 시료와 LPS(1 μ g/mL)를 함유한 새로운 배지를 동시에 처리하여 24시간 배양하였다. 생성된 NO의 양을 Griess reagent을 이용하여 세포배양 상등액 100 μ L와 Griess reagent[1 % (w/v) sulfanilamide, 0.1 % (w/v) naphthyl-ethylenediamine in 2.5 % (v/v) phosphoric acid] 100 μ L 를 혼합하여 96 well plates에서 10분 동안 반응시킨 후 ELISA microplate reader를 이용하여 540 nm에

서 흡광도를 측정하였다. 생성된 nitrite의 농도는 sodium nitrite를 DMEM 배지에 용해한 표준곡선을 이용하여 계산하였으며, LPS를 처리한 시험군과 LPS를 처리하지 않은 대조군에서 생성된 nitrite 양의 차이를 기준으로 각 시료의 NO 생성 저해활성을 확인하였다. 또한, 현재 알려진 NO 생성을 억제하는 물질로 L-arginine의 구조 유사체인 N-monomethyl-L-arginine (L-NMMA)와 비교하여 iNOS 유도 후 단계에 미치는 영향을 비교 조사하였다.



<그림> Measurement of nitric oxide(NO) production.

Effect of mixture, *Kalopanax*, *Dendropanax*, *Acanthopanax*, *Ginseng* on excessive NO and ROS production by LPS-stimulated Raw 264.7 cells. NO release were measured in the culture supernatant of Raw 264.7 cells treated with 0.01 μg/mL concentrations of samples with or without LPS (1 μg/mL) for 48 h. L-NMMA (50 μM) was used as a positive control drug for NO determination. Each value indicates the mean of 3-4 independent experiments.

*P < 0.05 and ** P < 0.01 versus LPS-treated cells

PG: *Panax ginseng* extract, AP: *Acanthopanax sessiliflorus* extract, KP: *Kalopanax pictus* extract, DP: *Dendropanax moribifera* extract, MP: Mixed extract.

대식세포에서 분비되는 대표적인 세포독성물질인 NO(Nitric Oxide) 생성에 대하여 10종 extract(홍삼, 오가피, 음나무, 황칠, 혼합물, 발효홍삼, 발효오가피, 발효음나무, 발효황칠, 혼합발효물)의 조절효과를 조사하였다. 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성균의 세포외막에 존재하며, Raw 264.7 세포와 같은 macrophage 또는 monocyte 에서 TNF-α, IL-6, IL-1β과 같은 pro- inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알

려져 있다. 염증유발에 관여하는 NO에 대한 억제율을 확인하기 위해, 대식세포인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여, 발효전 농축액과 발효후 농축액이 얼마나 NO생성을 억제하는지에 대한 실험을 실시하였다. 10종 시료에 의한 NO 생성 조절 정도는 LPS 단독 처리군에서 분비되는 NO양을 100 %로 환산하여 비교한 결과 모든 시료가 iNOS인 L-NMMA 보다 NO억제능이 낮았지만 발효전 농축액과 발효후 농축액을 비교하였을 때, 개별의 발효농축액이 발효전 농축액 보다 NO억제능이 더 좋은 것으로 보였으며, 그 중 혼합 발효물이 가장 높은 NO 억제능을 보였다. 10종의 농축액의 NO 억제능을 보면 발효물에서 혼합물>황칠>홍삼>음나무>오가피 순으로 억제능을 볼 수 있었다.

* 세포내 활성 산소종 소거능

각 농축액에 대한 산화적 손상을 보호하는 효과를 확인하기 위해 활성산소와 반응하여 형광을 발산하는 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCF-DA)를 이용하여 세포내에서 발생하는 활성산소의 정도를 측정하였다. 6-well plate에 2×10^5 개의 RAW 264.7 세포를 분주한 후 37°C , 5 % CO_2 배양기에서 24시간 동안 배양한 다음, 시료를 1시간 전 처리하였다. LPS(100 ng/mL)를 24시간 처리한 다음 DCF-DA를 최종 농도 $10 \mu\text{M}$ 이 되도록 넣고 37°C 에서 30분간 더 배양하였다. 이후, 상등액을 Black plate로 옮긴 후, ELISA reader를 이용하여(excitation: 484 nm, emission: 530 nm)에서 측정하였다. DCF 형광광도의 증가율은 대조군과 비교하여 배수(fold)로 계산 하였다.

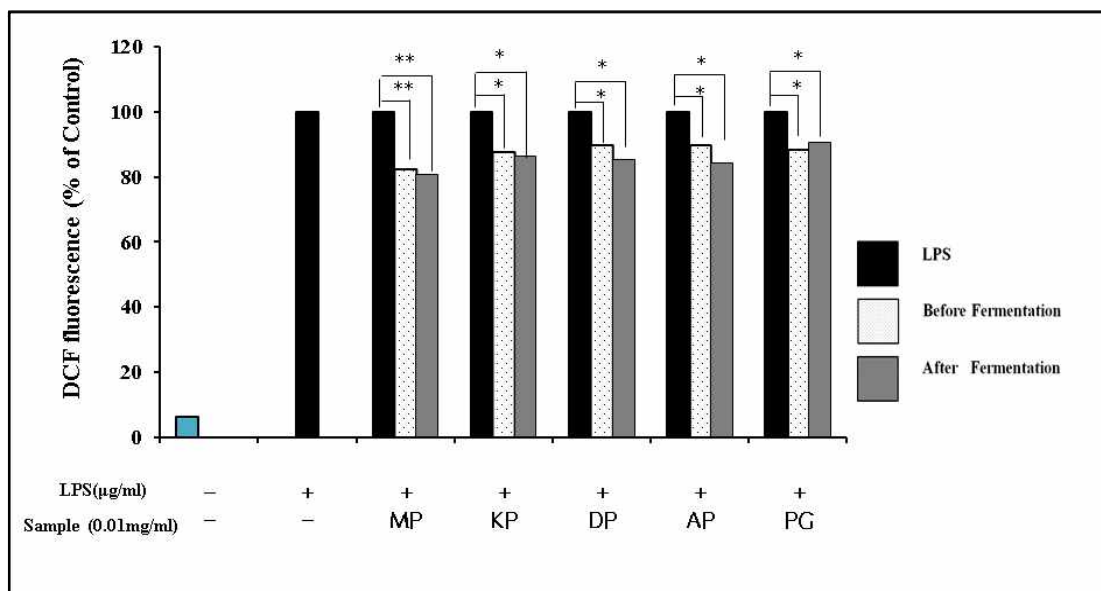


그림. Measurement of reactive oxygen species(ROS).

Effect of mixture, *Kalopanax*, *Dendropanax*, *Acanthopanax*, *Ginseng* on excessive NO and ROS production by LPS-stimulated Raw 264.7 cells. ROS production were measured in the culture supernatant of Raw 264.7 cells treated with 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations of samples with or without LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 48 h. L-NMMA (50 μM) was used as a positive control drug for NO determination. Each value indicates the mean of 3-4 independent experiments. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus LPS-treated cells

PG: *Panax ginseng* extract, AP: *Acanthopanax sessiliflorus* extract, KP: *Kalopanax pictus* extract, DP: *Dendropanax morbiifera* extract, MP: Mixed extract.

ROS 분비는 innate immunity와 관련성이 크며, 대식세포와 같은 탐식세포가 pattern recognition에 의한 특정 표면항원의 활성이 유도되어 조절되는 것으로 알려져 있다.

10가지 extract(홍삼, 오가피, 음나무, 황칠, 혼합물, 발효홍삼, 발효오가피, 발효음나무, 발효황칠, 혼합발효물)이 LPS에 의한 RAW 264.7 세포내의 ROS 생성에 미치는 효과를 DCF-DA assay를 통하여 검토하였다. 먼저 RAW 264.7 세포에 0.01 mg/mL의 추출물을 전 처리한 다음, LPS로 세포 내의 ROS 생성을 유도하여 DCF 형광강도를 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비하여, LPS를 단독 처리한 실험군에서는 유의성 있는 형광강도의 증가를 보였다. 이로써 LPS의 처리가 RAW 264.7 세포 내의 ROS 생성을 효과적으로 유도하였음을 알 수 있었다. Fig. 11 세포 내 ROS(Reactive Oxygen Species) 생성량에 미치는 영향은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, 농축액 투여군 (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 발효전과 발효후의 ROS 생성 억제 량에 많은 차이가 나지 않지만 대조군에 비하여 ROS 생성을 억제하는 것을 알 수 있었다. 그중에서 혼합발효농축액이 ROS 생성 억제능이 좋은 것으로 나타났다.

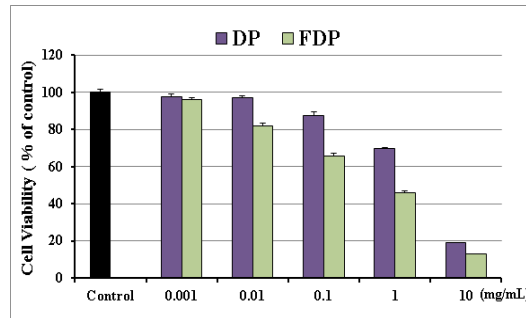
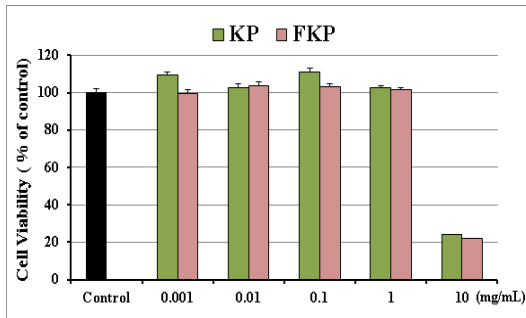
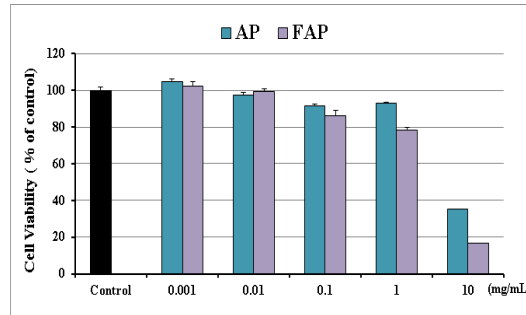
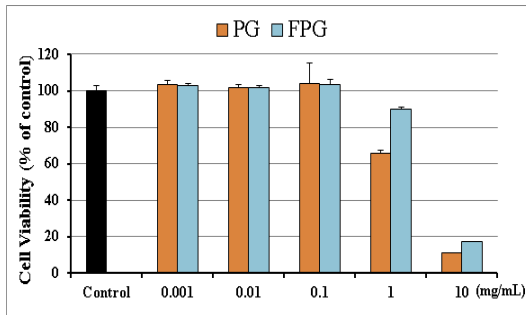
④ 항암 활성 측정

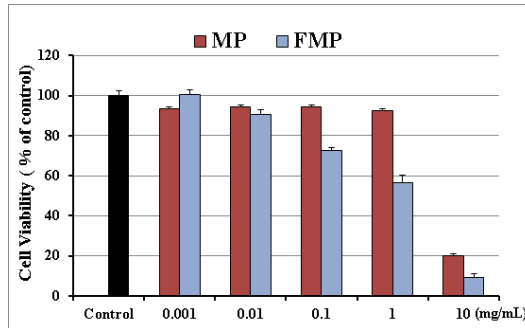
* A549 cell 배양

실험에 사용한 폐암세포주인 A549 cell은 한국세포주은행 (KTCC, Seoul, Korea)에 서 분양 받아 사용하였다. A549세포는 10 % FBS(fetal bovine seum)를 함유한 RPMI1640 배지를 이용하였고 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다.

* 암세포 증식 억제 효과

농축액의 암세포 억제활성을 측정하기 위해 2 mM Thymidine (Sigma-Aldrich)를 24 시간 동안 처리하여 세포의 성장을 중지시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 그 후 스크래퍼 (scraper)를 이용하여 창상 선을 만든 후 다시 PBS로 2회 세척하고 다양한 농도의 추출물을 처리하였다. 세포이동 정도는 일정한 시면적에 이동한 세포 수를 세어 이동한 세포수의 비율을 계산하여 평가하였다.





<그림> Cell viability in A549 cells.

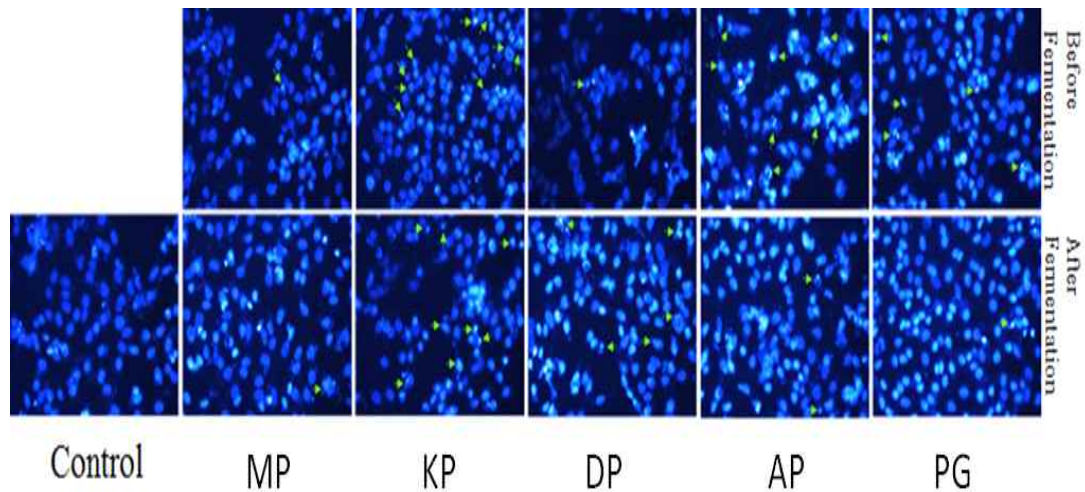
Human lung carcinoma cells (A549) exposed to samples 1. PG, 2. FPG, 3. AP, 4. FAP, 5. KP 6. FKP, 7. DP, 8. FDP, 9. MP, 10. FMP over a period of 48h treatment. Cytotoxicity was tested at 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 mg/mL. The 10 samples at 10 mg/mL exhibit significant cytotoxicity. All results are representative of three independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$.

PG: *Panax ginseng* extract, FPG: Fermented *Panax ginseng* extract, AP: *Acanthopanax sessiliflorus* extract, FAP: Fermented *Acanthopanax sessiliflorus* extract, KP: *Kalopanax pictus* extract, FKP: Fermented *Kalopanax pictus* extract, DP: *Dendropanax moribifera* extract, FDP: Fermented *Dendropanax moribifera* extract, MP: Mixed extract, FMP: Fermented mixed extract.

무발효 농축액과 발효 농축액을 A549 폐암 세포에 처리하여 생물학적 활성을 분석하는 테스트를 실시하였다. 모든 시료가 처리 48시간 후 10 mg/mL에서 독성이 높은 것을 알 수 있다. 오직 10가지 샘플 중에서 발효한 황칠농축액만 0.01 mg/mL에서 세포 생존 능력이 현저히 감소하였다. 또한, 황칠이 포함된 발효 혼합물도 0.1 mg/mL에서 세포 생존 능력이 감소하였다는 것을 보여준다. 1 mg/mL의 농도에서, 비발효 황칠, 홍삼과 발효된 혼합물과 오가피에서 크게 세포 생존능력이 감소하였으며, 10 mg/mL 농도에서는 모든 추출물에서 세포생존율이 크게 낮아졌다.

* Hoechst staining

세포 사멸의 대표적인 현상인 chromatin condensation과 fragmentation을 확인 할 수 있는 Hoechst staining을 수행 하였다. 12well plate에 2×10^5 의 세포를 plating하고 37 °C에서 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양했다. 이후 추출물을 처리하지 않은 대조군과 추출물을 0.1 mg/mL을 처리한 실험군을 24시간 배양한 후 DPBS로 well을 washing 했다. 2 %의 paraformaldehyde를 300 uL/well 처리하고 15분간 incubation 함으로써 cell을 fixation 했다. 그 후 DPBS를 이용해 paraformaldehyde를 washing해 주고 0.5 %의 triton×100을 300 uL/well 처리하고 10분 후 1 nM의 Hoechst 33258을 처리해 주고 30분간 암 반응 시킨 후 관찰했다.



<그림> Analysis of apoptosis by fluorescent microscopy.

PG: *Panax ginseng* extract, AP: *Acanthopanax sessiliflorus* extract, KP: *Kalopanax pictus* extract, DP: *Dendropanax morbifera* extract, MP: Mixed extract.

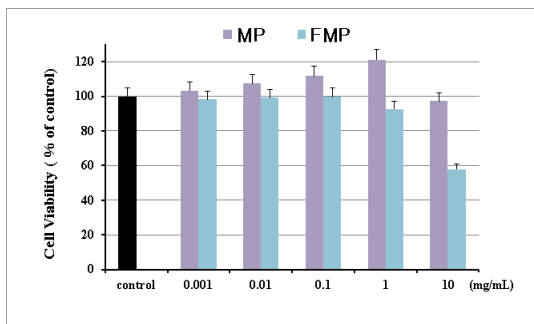
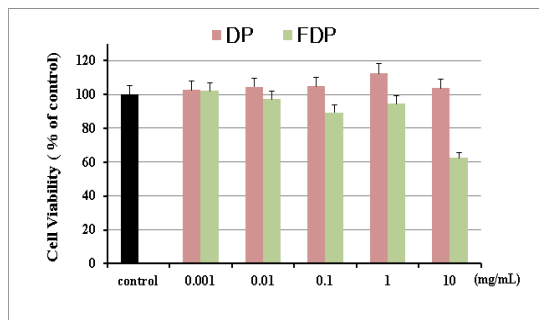
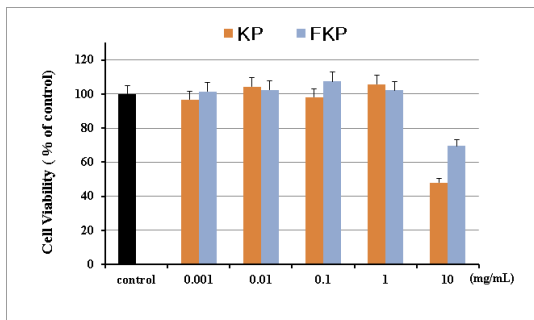
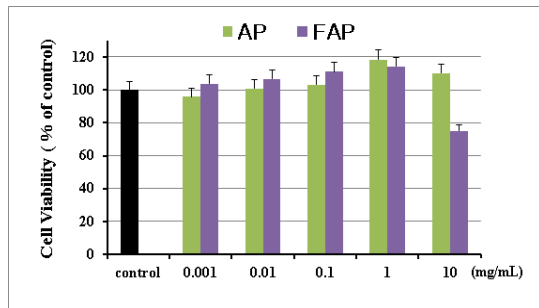
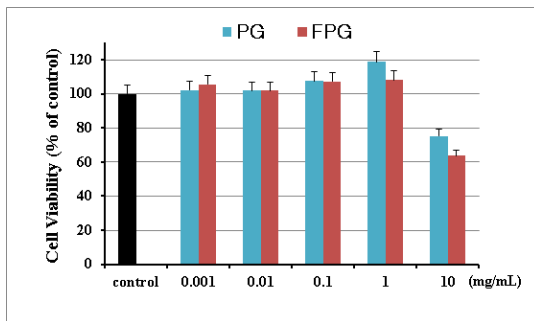
Cancer cell에 대한 10종 extract(홍삼, 오가피, 음나무, 황칠, 혼합물, 발효홍삼, 발효 오가피, 발효음나무, 발효황칠, 혼합발효물)의 영향을 알아보기 위해서 apoptosis의 대표적인 현상인 chromatin condensation과 chromatin fragmentation을 관찰 할 수 있는 Hoechst staining을 수행하였다. 인간의 폐암세포 A549에 대하여 1 mg/mL의 10종 엑스를 처리한 실험 군에서 Hoechst 33258 염색법을 통해 세포 사멸을 관찰한 결과, 10개의 표본 중에서 무발효와 발효 음나무 농축액에서 크게 세포사멸을 유도됨을 알 수 있었으며 무발효 오가피 농축액 역시 화살표로 표시된 것처럼 핵 파괴와 사멸된 형태를 보였다.

세포사멸 단계 중 DNA fragmentation 이전에 nucleus structure의 변화와 더불어 chromatin의 응축현상이 일어나는데, 아래 실험 결과를 토대로 볼 때, 발효 전후의 음나무 농축액과 무발효 오가피 농축액 처리에 의해서 암세포가 세포사멸 단계로 접어드는 것으로 사료된다.

⑤ 항비만 활성 측정

* 3.5.6.1. 3T3-L1 cell 배양 및 분화

한국세포주은행으로 부터 분양받은 3T3-L1 세포주는 10 % FBS를 함유한 DMEM 배지(Gibco, Grand Island, NY, USA)를 이용하였고 37 °C, 5 % CO₂ 조건에서 배양하였다. 3T3-L1 지방세포의 분화를 위하여 3T3-L1 지방세포가 약 70 %의 confluency를 나타낼 때 분화유도물질 (10 g/mL insulin, 0.25 M dexamethasone, 0.5 mM 1-methyl-3 -isobutylwanthine) 을 첨가시킨 DMEM 배양액으로 2일간 지방세포 분화를 유도한 다음 10 % FBS를 함유하는 DMEM 배양액에서 7일간 배양하여 80 % 이상 지방 입자 축적을 확인하였다.



<그림> Cell viability in 3T3-L1 cells.

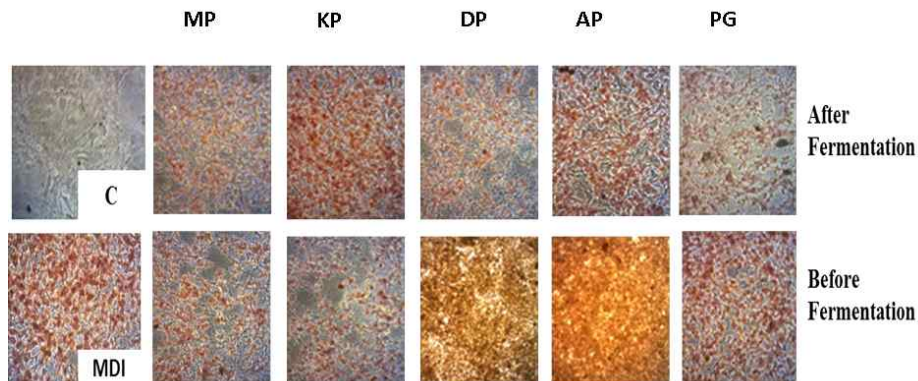
To study the cytotoxicity of effect of 1.PG, 2.FPG, 3.AP, 4.FAP, 5.KP, 6.FKP, 7.DP, 8.FDP, 9.MP, 10.FMP on cytotoxicity on 3T3-L1 cell MTT assay is performed.

PG: *Panax ginseng* extract, FPG: Fermented *Panax ginseng* extract, AP: *Acanthopanax sessiliflorus* extract, FAP: Fermented *Acanthopanax sessiliflorus* extract, KP: *Kalopanax pictus* extract, FKP: Fermented *Kalopanax pictus* extract, DP: *Dendropanax morbifera* extract, FDP: Fermented *Dendropanax morbifera* extract, MP: Mixed extract, FMP: Fermented mixed extract.

10개의 샘플이 3T3-L1 세포에 세포 독성을 연구하기 위해 MTT 세포 독성 분석법을 수행하였다. 세포(1×10^4 cells/well)를 37 °C에서 각각의 샘플을 다양한 농도(0.001 mg to 10 mg/mL)로 배양하였다. 1 mg/mL의 농도로도 Fig. 18에서 보는 것과 같이 10개의 샘플이 3T3-L1 세포 생존력에 유의한 억제 효과가 없었다. 그리고 발효전 농축액이 발효후 농축액 보다는 세포 생존이 좋은 것으로 판단할 수 있었다. 발효전 혼합물, 음나무, 황칠, 오가피, 홍삼과 발효후 혼합물, 음나무, 황칠, 오가피, 홍삼은 pre-adipocyte cell line인 3T3-L1 대한 현저한 독성을 나타내지 않는 것을 발견하였다. 발효 혼합물, 황칠은 80 % 이상의 세포 생존율을 보이며 3T3-L1 cell line에 대한 독성 또한 없다는 것을 보여주었다.

* Oil red staining

세포내 축적 생성을 확인하기 위하여 Oil Red staining을 실시하였다. 준비된 3T3-L1 지방전구세포를 PBS로 세척한 후 3.7 % formaldehyde로 1시간 고정하고 60 % isopropanol을 이용하여 세척, 건조 후 Oil Red staining 용액을 처리하여 상온에서 20분간 염색하였다. 염색 후 60 % isopropanol과 증류수를 사용하여 세척한 다음 염색된 세포를 현미경을 이용하여 관찰하였다. 또한 염색된 지방의 정량적 분석을 위하여 100 % isopropanol로 용해시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다

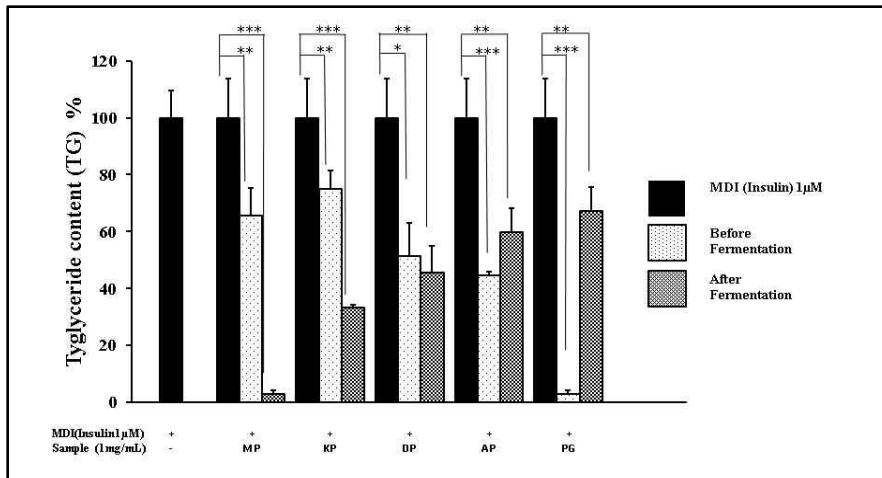


<그림> Measurement of oil red staining.

To investigate the lipid accumulation on 3T3-L1 oil red staining and triglyceride content (TG) were performed.

PG: *Panax ginseng* extract, AP: *Acanthopanax sessiliflorus* extract, KP: *Kalopanax pictus* extract, DP: *Dendropanax morbiifera* extract, MP: Mixed extract.

3T3-L1 Oil red 염색에 지질축적을 조사하고 Triglyceride(TG) contented 시행하였다. 전 지방 세포는 24 well plate에서 1×10^4 의 밀도로 플레이팅 하였다. 전 지방 세포의 완전 합류한 후, 차별화 media (IBMX 51.8 mM, Dexamethasone 1mM, Insulin $10 \mu\text{M}$)에 샘플을 처리하지 않거나 하는 것을 14일까지 유도했다. 하루에 14 셀을 붉은 유염료로 염색하고 가볍게 물로 씻어냅니다. 그리고 초점 촬영 사진을 Fig. 19과 같이 표시 됩니다. 발효 혼합물, 황칠, 오가피는 대조군인 MDI 처리된 세포와 비교하여 효율을 나타낸다.



<그림> Measurement of triglyceride content.

Triglyceride content was measured by dissolving the lipid droplet 100 % isopropanol which were indicated in fig. 19 compared to MDI-treated cells, MP, KP, DP, AP, GP and fermented MP, KP, DP, AP, GP decreased TG content in differentiated adipocytic 3T3-L1 cells which are indicated as MDI. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ when compared with control MDI.

PG: *Panax ginseng* extract, AP: *Acanthopanax sessiliflorus* extract, KP: *Kalopanax pictus* extract, DP: *Dendropanax morbiifera* extract, MP: Mixed extract.

Triglyceride 함량은 100 % isopropanol 지방을 용해시켜 측정치를 Fig. 20에 표시 하였다. MDI-처리 된 세포에 비해, 발효전 혼합물, 음나무, 황칠, 오가피, 홍삼 및 발효 후 혼합물, 음나무, 황칠, 오가피, 홍삼은 MDI로 표시되는 adipocytic 분화된 3T3-L1 세포에서 TG 함량을 감소시켰다.

발효전 농축액과 발효후 농축액 샘플 모두 MDI 세포를 치료에 비해 좋은 효과를

보였다. 발효전 농축액 중 홍삼은 MDI처리 세포와 비교하여 더 우수하게 나타났다. 또한 발효 농축액 샘플 중 혼합물, 음나무, 황칠은 발효전 농축액 및 MDI처리 세포에 비해 Triglyceride contents(TG)의 현저한 감소를 나타냈다. 특히 발효 농축액 중 혼합발효농축액이 3T3-L1 adipocyte cell에서 지질 축적을 현저하게 감소시키고 세포 내에서 지방 세포의 기능을 억제하는데 매우 효과를 보이는 것으로 사료된다.

발효전 농축액과 발효후 농축액을 일정량 희석해서 항산화활성을 비교하였으며, 대조군으로 Ascorbic acid를 사용하였다. 원료 중 황칠 원료가 항산화활성이 좋았으며, 발효과정을 거친 발효황칠농축액이 발효 전 보다 항산화활성이 더욱 좋아진 것을 확인 할 수 있었다. 발효전의 농축액에서는 오가피와 황칠, 음나무 순으로 항산화활성이 좋았으며, 발효과정을 거친 농축액에서는 황칠, 오가피, 혼합물 순으로 항산화활성이 좋은 것을 확인 할 수 있었다. 원료마다 발효를 통한 항산화활성 증대가 차이가 있었으며 황칠의 경우가 발효를 통한 항산화활성 증대 효과를 볼 수 있었다.

항염 활성 비교에 있어서 대식세포인 RAW 264.7 세포를 사용하여 10종 농축액(홍삼, 오가피, 음나무, 황칠, 혼합물, 발효홍삼, 발효오가피, 발효음나무, 발효황칠, 혼합발효물)를 농도별로 대식세포에 처리한 후, MTT assay 방법으로 세포 생존율로서 세포 독성 유무를 확인하였다. 그 결과 발효전 농축액과 발효후 농축액 모두 0.01 mg/mL에서 80 %이상의 유의적인 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 0.01 mg/mL 농도에서 항염증효과 확인시험을 진행하더라도 세포독성에서 기인한 억제효과는 나타나지 않을 것으로 판단하였다. 특히 1 mg/mL에서 발효 농축액이 발효전 농축액보다 세포독성이 낮다는 것을 특이적으로 확인 할 수 있었다.

대식세포에서 분비되는 대표적인 세포독성물질인 NO(Nitric Oxide) 생성에 대하여 10종의 발효 전후의 농축액의 조절효과를 조사하였다. 내독소로 잘 알려진 lipopolysaccharide(LPS)는 그람 음성균의 세포외막에 존재하며, Raw 264.7 세포와 같은 macrophage 또는 monocyte에서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 과 같은 pro-inflammatory cytokine을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 염증유발에 관여하는 NO에 대한 억제율을 확인하기 위해, 대식세포인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여, 발효전 농축액 및 발효농축액이 얼마나 NO생성을 억제하는지에 대한 실험을 실시하였다. 10종 농축액에 의한 NO 생성 조절 정도는 LPS 단독 처리군에서 분비되는 NO양을 100 %로 환산하여 비교한 결과 모든 시료가 iNOS 인 L-NMMA 보다 NO억제능이 낮았지만 발효전 농축액과 발효 농축액을 비교하였을 때, 발효 농축액이 발효전 농축액보다 NO억제능이 더 좋은 것으로 보였으며, 그 중 발효 혼합물이 가장 높은 NO 억제

능을 보였다. 10종의 농축액의 NO 억제능을 보면 발효농축액에서 혼합물>황칠>홍삼>음나무>오가피 순으로 억제능을 볼 수 있었다.

ROS 분비는 innate immunity와 관련성이 크며, 대식세포와 같은 탐식세포가 pattern recognition에 의한 특정 표면항원의 활성이 유도되어 조절되는 것으로 알려져 있다. 10가지 농축액이 LPS에 의한 RAW 264.7 세포 내의 ROS 생성에 미치는 효과를 DCF-DA assay를 통하여 검토하였다. 먼저 RAW 264.7 세포에 0.01 mg/mL의 추출물을 전 처리한 다음, LPS로 세포 내의 ROS 생성을 유도하여 DCF 형광강도를 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처리도 하지 않은 대조군에 비하여, LPS를 단독 처리한 실험군에서는 유의성 있는 형광강도의 증가를 보였다. 이로써 LPS의 처리가 RAW 264.7 세포 내의 ROS 생성을 효과적으로 유도하였음을 알 수 있었다. 세포 내 ROS(Reactive Oxygen Species) 생성량에 미치는 영향은 대조군이 정상군에 비하여 큰 폭으로 증가하였으며, 농축액 투여군 (0.01 μ g/mL)은 발효전과 발효후의 ROS 생성 억제 량에 많은 차이가 나지 않지만 대조군에 비하여 ROS 생성을 억제하는 것을 알 수 있었다. 그중에서 발효혼합농축액이 ROS 생성 억제능이 좋은 것으로 나타났다.

항암 활성 비교에 있어서는 세포 독성을 평가하기 위해 서로 다른 농도에서 평가 하였다. 오직 10가지 농축액 중에서 발효 황칠농축액만 0.01 mg/mL에서 세포 생존 능력이 현저히 감소하였다.

Cancer cell에 대한 10종 농축액의 영향을 알아보기 위해서 apoptosis의 대표적인 현상인 chromatin condensation과 chromatin fragmentation을 관찰 할 수 있는 Hoechst staining을 수행하였다. 인간의 폐암세포 A549에 대하여 1 mg/mL의 10종 엑스를 처리한 실험군에서 Hoechst 33258 염색법을 통해 세포 사멸을 관찰한 결과, 10개의 농축액 중에서 발효전과 발효후 음나무 농축액에서 크게 세포사멸을 유도됨을 알 수 있었으며 발효전 오가피 농축액 역시 세포핵 파괴와 사멸된 형태를 보였다. 세포 사멸 단계 중 DNA fragmentation 이전에 nucleus structure의 변화와 더불어 chromatin의 응축현상이 일어나는데, 아래 실험 결과를 토대로 볼 때, 발효 전후의 음 나무 농축액과 발효전 오가피 농축액 처리에 의해서 암세포가 세포사멸 단계로 접어드는 것으로 보였다.

EGF를 투입하지 않은 EGF 무자극과 EGF를 투입한 EGF 자극(20 ng/mL)로 암세포 생육저해효과를 분석한 결과, 그림 Fig. 14와 같이, EGF로 자극을 준 암세포에서는 빠른 암세포 증식이 있었지만, 10가지 농축액을 처리한 군에서는 EGF군과 비교하여 생육이 저해됨을 알 수 있었다. 하지만, 발효전 과 발효후의 변화에서는 크게 유의한 차이

가 없음을 알 수 있었다.

피부미백 활성화에 있어서 피부미백 화합물은 직접 tyrosinase 저해 및 멜라닌 생합성 저해에 의해 B16BL6 흑색 종 세포에서 멜라닌 생성을 억제한다. B16BL6 세포에서 1. 혼합물 2. 음나무, 3. 황칠 4. 오가피, 5. 홍삼에서 발효전 및 발효후 농축액의 멜라닌 형성 억제 효과를 조사했다. 세포(1×10^5 cells/well) 2일 동안 각 샘플의 다양한 농도로 배양하였다. 1 mg/mL에서는 발효전 오가피농축액과 혼합물에서 세포 생존율이 높았다. 그리고 0.1 mg/mL에서 발효황칠농축액에서만 80 %이하의 생존율을 보였으며, 0.01 mg/mL에 10개의 농축액 모두 독성효과를 보이지 않았다. 발효전 및 발효후 농축액이 세포 B16BL6에서 세포 독성 가능성이 있는지 여부를 평가하고 발효전 및 발효후 농축액 모두는 0.01 mg/mL로 유의한 세포 독성 효과를 갖지 않는 것을 발견했다.

세포 tyrosinase 활성화의 억제 효과에서 세포(5×10^5 cells)를 2일간 $1 \mu\text{M}$ α -MSH 또는 알부틴의 존재 하에 샘플을 다양한 농도로 처리하였다. 세포 용해물에서 tyrosinase 활성화는 DOPA oxidase 활성화 분석으로 결정하였다. 발효전의 농축액에서는 음나무>혼합물>홍삼>황칠>오가피 순으로 tyrosinase 활성화의 억제 효과가 좋았으며, 발효후의 농축액에서는 혼합물>홍삼>황칠>음나무>오가피 순을 보였다.

모든 샘플이 크게 0.01 mg/mL에서 멜라닌 합성 및 tyrosinase를 억제하는 것을 발견하여 이러한 결과는 0.1 mg/mL 농도의 알부틴에서 발견되는 것에 비하여 더 효과를 나타낸다. 5가지 발효전 농축액 중에서 음나무는 cellular tyrosinase을 저해와 멜라닌 양을 줄이는 가장 좋은 결과를 나타냈다. 5가지 발효 농축액의 경우에는 혼합물이 세포의 tyrosinase 분석에서 최고의 효과를 나타내었다. 혼합물과 음나무에서는 세포의 멜라닌 함량을 감소시키는 유사한 결과를 보여준다.

세포(2×10^5 cells/well)를 2일간 α -MSH의 $1 \mu\text{M}$ 의 존재 하에 농축액과 알부틴을 다양한 농도로 배양하였다. PBS로 세척 후, 세포를 트립신 화에 의해 수확하였다. 세포 펠렛은 1시간 80 °C에서 10 % DMSO를 포함하는 1 N NaOH를 500 μL 에 용해되었다. 각각의 멜라닌 함량은 ELISA 리더에서 475 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다. B16BL6 멜라닌 세포의 생존율을 저하시키지 않고 멜라닌 생산을 감소시키는 B16BL6 세포에 1 혼합물 2 음나무 3 황칠 4 오가피 5 홍삼 발효전 및 발효후 농축액의 잠재적인 항멜라닌 형성을 발견했다. 특히 발효 혼합물(FMP)와 무발효 음나무(KP)는 0.1 mg/mL 농도의 알부틴을 사용한 것보다 높은 멜라닌 생산 감소 결과를 나타냈다.

항비만 활성화 비교에 있어서는 10개의 농축액이 3T3-L1 세포에 세포 독성을 연구하

기 위해 MTT 세포 독성 분석법을 수행하였다. 세포(1×10^4)를 37°C 에서 각각의 샘플을 다양한 농도(0.001 mg to 10 mg/mL)로 배양하였다. 1 mg/mL의 농도로도 Fig 18에서 보는 것과 같이 10개의 농축액이 세포 생존력에 유의한 억제 효과가 없었다. 그리고 발효전 농축액이 발효 농축액 보다는 세포 생존이 좋은 것으로 판단할 수 있었다. 발효전 혼합물, 음나무, 황칠, 오가피, 홍삼과 발효 혼합물, 음나무, 황칠, 오가피, 홍삼은 pre-adipocyte cell line인 3T3-L1 대한 현저한 독성을 나타내지 않는 것을 발견하였다. 발효 혼합물, 황칠은 80 % 이상의 세포 생존율을 보이며 3T3-L1 cell line에 대한 독성 또한 없다는 것을 보여주었다.

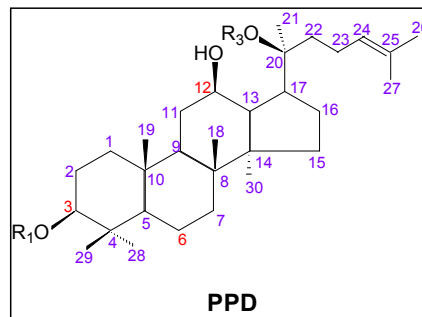
3T3-L1 오일 빨간색 염색에 지질축적을 조사하고 Triglyceride(TG) contained 시행하였다. 전 지방 세포는 24 well plate에서 1×10^4 의 밀도로 플레이팅 하였다. 전 지방 세포의 완전 합류한 후, 차별화 media(IBMx 51.8 mM, Dexamethasone 1 mM, Insulin $10 \mu\text{M}$)에 샘플을 처리하지 않거나 하는 것을 14일까지 유도했다. 하루에 14 셀을 붉은 유염료로 염색하고 가볍게 물로 씻어냅니다. 그리고 초점 촬영 사진을 그림 19과 같이 표시 됩니다. 발효 혼합물, 황칠, 오가피는 대조군인 MDI 처리된 세포와 비교하여 효율을 나타낸다.

트리글리세리드 함량은 100 % isopropanol 지방을 용해시켜 측정치를 Fig 20에 서 확인할 수 있다. MDI-처리 된 세포에 비해, 발효전 혼합물, 음나무, 황칠, 오가피, 홍삼 및 발효 처리한 혼합물, 음나무, 황칠, 오가피, 홍삼은 MDI로 표시되는 adipocytic 분화된 3T3-L1세포에서 TG 함량을 감소시켰다.

발효전 농축액과 발효 농축액 샘플 모두 MDI 세포를 치료에 비해 좋은 효과를 보였다. 발효전 농축액 중 홍삼은 MDI처리 세포와 비교하여 더 우수하게 나타났다. 또한 발효 농축액 샘플 중 혼합물, 음나무, 황칠은 발효전 농축액 및 MDI처리 세포에 비해 Triglyceride contents(TG)의 현저한 감소를 나타냈다. 특히 발효 농축액 중 발효 혼합물 농축액이 3T3-L1 adipocyte cell 에서 지질 축적을 현저하게 감소시키고 세포 내에서 지방 세포의 기능을 억제하는데 매우 효과를 보이는 것으로 판단된다.

2. 돌외를 이용한 인삼 사포닌의 전환

돌외(*Gynostemma pentaphyllum*)는 박과(Cucurbitaceae)에 속하는 다년생 덩굴성 초본류로서(Blumert and Liu, 1999), 예로부터 칠엽담(七葉膽)이라고 하여 주로 전초 또는 지상부위를 약용으로 이용해 왔다. 돌외에는 다량의 사포닌 성분이 함유되어 있으며 지상부로부터 사포닌을 분리하여 이를 gypenoside라고 명명 한 것을 계기로 지금까지 약 100여 종의 사포닌이 분리 된 것으로 보고되고 있다. 돌외에는 진정 효과를 가지고 있다고 알려진 protopanaxdiol계 사포닌(PPD)을 다량 함유하고 있으며 그 중 gypenoside V는 돌외의 대표적인 major 성분으로 알려져 있다.

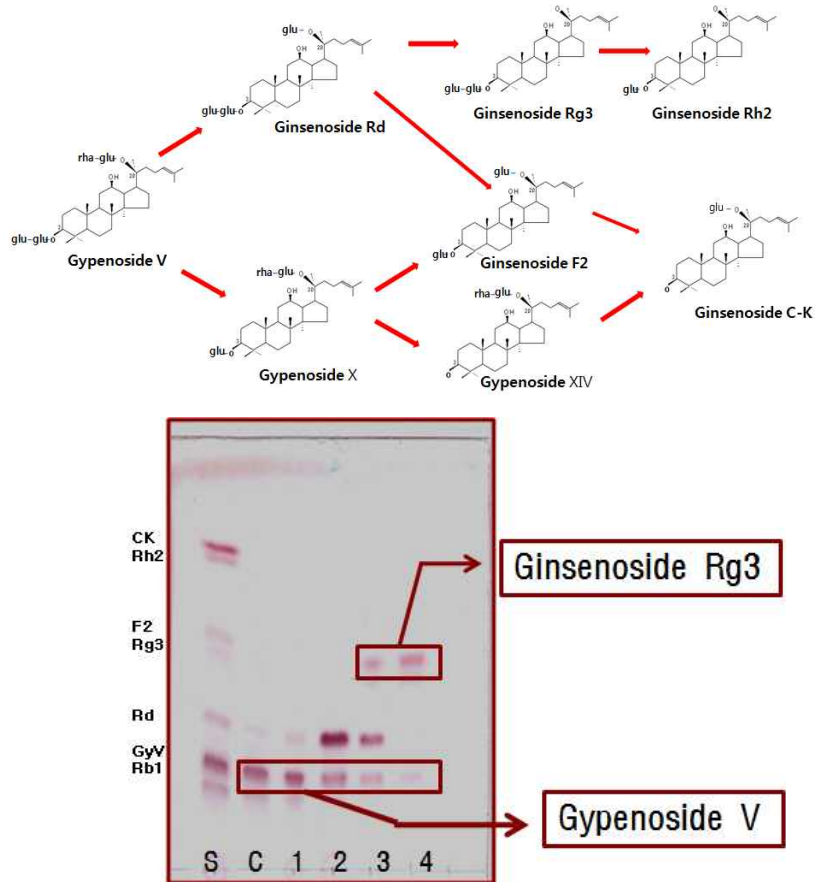


종류	R1	R2
ginsenoside Rb1	glu(2→1)glu	glu(6→1)glu
gypenoside V	glu(2→1)glu	glu(6→1)rha

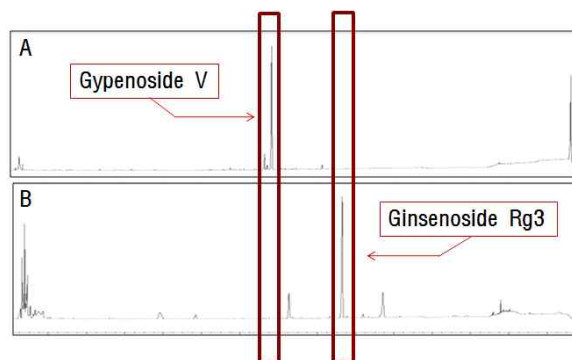
돌외의 gypenoside V는 ginsenoside Rb1과 비교하였을 때 C-20에 결합 되어진 당의 한 종류가 gypenoside V이 glucose-rhamnose인 것에 반하여 ginsenoside Rb1의 경우 glucose-glucose 결합 구조를 가지고 있어 결합되어진 당의 한 부분만을 제외하면 동일 구조를 가지고 있는 것을 알 수 있다. 따라서 gypenoside V에서 rhamnose를 가수 분해 시킨다면 인삼의 ginsenoside Rd 및 다양한 인삼 사포닌으로의 변환이 가능하다.

이에 본 연구에서는 돌외의 gypenoside V를 이용하여 인삼의 minor 사포닌으로 전환을 수행하고자 하며, 전환 효소는 본 연구팀에서 개발한 미생물 효소를 활용하고자 하였다.

<그림> 돌외의 gypenoside V의 ginsenoside Rg3로의 전환



본 연구에서 이용한 Gypenoside V의 전환 결과 ginsenoside Rg3가 생성됨을 확인 할 수 있었다.



<그림> 돌외의 gypenoside V의 ginsenoside Rg3로의 전환

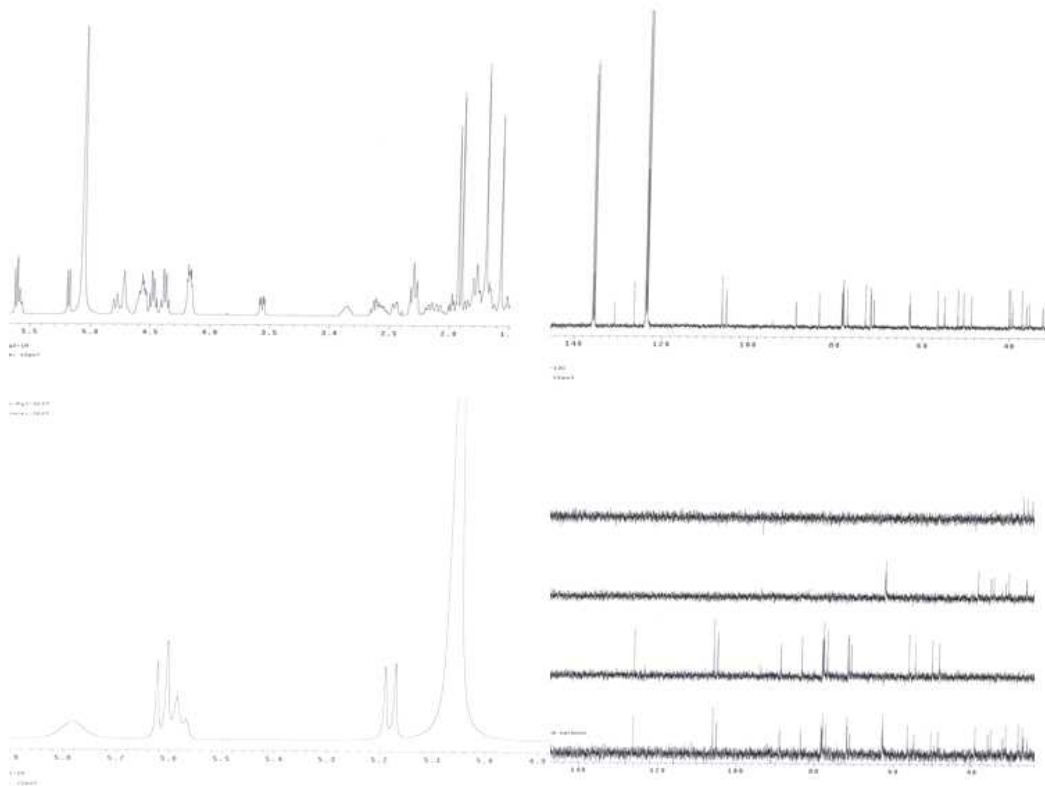
HPLC를 이용한 정량 분석을 통해 Gypenoside V가 ginsenoside Rd, ginsenoside Rg3으로 전환된 산물의 양을 확인 하였다. Strain GS514 균주로부터 유래된 효소는 gypenoside V 10mg을 최종적으로 ginsenoside Rd 0.8mg과 ginsenoside Rg3 4.9mg으로 변환 시킬 수 있었다. 본 연구는 인삼 사포닌과 구조적으로 유사한 물질이 생물전환을 통하여 인삼 사포닌화 될 수 있다는 것을 확인한 결과로 고부가가치의 인삼 사포닌을 보다 저비용으로 생산할 수 있다는 점에서 유용할 것으로 사료 되며, 산업적으로 응용할

경우 원가경쟁력을 갖춘 기능성 소재를 개발 할 수 있을 것으로 기대된다. 분리 한 물질을 NMR을 통하여 구조 동정 하였으며, 인삼외의 식물로부터 인삼 사포닌 Rg3가 생성 되었음을 재 확인 하였다.

<표> ^{13}C -NMR spectrum of ginsenoside Rg3

C	20(R)-Rg3	20(S)-Rg3	Sample	C	20(R)-Rg3	20(S)-Rg3	Sample
1	39.2	39.2	39.3	22	43.3	36.0	36.0
2	26.7	26.8	26.9	23	22.7	23.1	23.2
3	89.0	89.0	89.0	24	126.1	126.4	126.3
4	39.8	39.8	39.8	25	130.8	130.8	130.7
5	56.4	56.5	56.5	26	25.9	25.9	25.9
6	18.5	18.5	18.6	27	17.7	17.1	17.2
7	35.2	35.3	35.3	28	28.2	28.2	27.2
8	40.0	40.1	40.1	29	16.6	16.7	16.8
9	50.4	50.5	50.5	30	17.4	17.8	17.8
10	37.0	37.0	37.0	3-O-inn er-Glc- 1	105.2	105.2	105.1
11	32.2	32.1	32.2	2	83.5	83.5	83.6
12	70.9	71.0	71.1	3	78.0	78.0	78.0
13	49.3	48.7	48.7	4	71.8	71.8	71.7
14	51.9	51.8	51.8	5	78.1	78.3	78.3
15	31.5	31.4	31.5	6	62.9	62.9	62.9
16	26.8	26.9	27.0	Outer- Glu-1	106.1	106.1	106.1
17	50.7	54.9	54.9	2	77.2	77.2	77.2
18	15.9	15.9	16.0	3	78.4	78.4	78.4
19	16.4	16.4	16.5	4	71.7	71.7	71.7
20	73.0	73.0	73.0	5	78.3	78.2	78.2
21	22.8	28.2	28.3	6	62.8	62.8	62.8

<그림> NMR을 이용한 gypenoside V의 ginsenoside Rg3 전환 산물의 구조 동정



2. 황칠의 발효를 통한 제품 소재 개발

본 연구에서는 1세부 과제에서 개발된 유산균주를 이용하여 고사포닌이 함유된 발효 황칠을 개발하여 항염증, 면역증강, 항산화, 항비만, 항암 건강기능성식품 개발을 탐색하고 건강기능 제품개발을 통한 산업화를 하고자 한다.

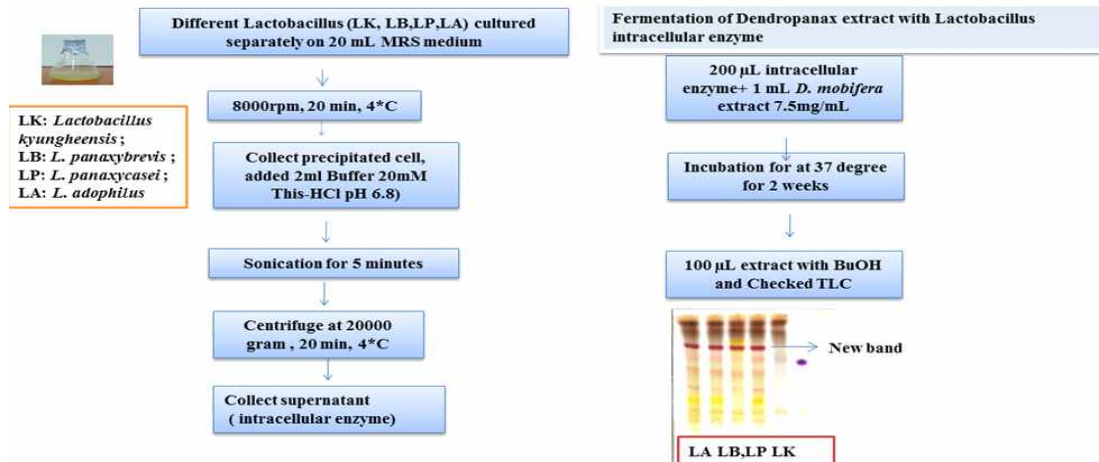
(1) 시제품의 생산

<시료 제작 원료 및 방법>


- ㉠ 발효음식물에서 사포닌의 변환활성 유산균 선발
 - MRS 배지를 이용한 유산균 분리
- ㉡ 생물학적 전환 미생물 스크리닝 방법의 개발
 - 유산균을 황칠추출액과 반응시킨 후 TLC 로 확인
- ㉢ 균주의 최적생산조건과 최적 활성 조건 확립
 - 균주의 최적 성장조건 탐색 (배지, 온도, pH 및 교반속도 결정)

<고사포닌 함유된 황칠 열수 추출물 제조공정>

- ㉠ 원료
 - 황칠은 진도군 산림조합에서 구입하여 사용하였다.
- ㉡ 발효균주
 - 1세부과제에서 개발된 *Lactobacillus panaxibrevis* DCY65를 활용하였다.
- ㉢ 고사포닌이 함유된 황칠 추출물 제조 방법
 - 발효물 제조방법은 200uL 의 4개 유산균과 1ml 황칠추출물을 혼합하여 2주 동안 발효하였다.
- ㉣ 고사포닌이 함유된 황칠 추출물의 원료소재를 위한 농축 및 건조



<그림> 고사포닌이 함유된 황칠 추출물 제조 공정도

 <div style="text-align: center;">제 조 공 정 서</div>		관리번호																																																																
		MS-30-048																																																																
		주 소 로 2014. 10. 14																																																																
		주 소 가 서울특별시																																																																
계 목 명	발효황칠추출물	계 목 단위																																																																
계 목의 구성	약재(발효소재) / 약재 / 용매	생산량																																																																
단 위 명	액상	비 고																																																																
품질 관리	1. 약재의 특성상 약재 용해도가 높을수록 2. 용해도가 높을수록, 농축할수록	약재, 용매, 온도 확인																																																																
품질 관리	1. 농축할 수 있도록 맞게 조절한다.	원사, 용매 확인 + 온도 조절																																																																
총 량	1. 혼합된 총량을 아래 비율순서에 순서로 혼합하여 넣는다.	+ 혼합물																																																																
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>No</th> <th>성분명</th> <th>비율(%)</th> <th>비율량 (g)</th> <th>No</th> <th>성분명</th> <th>비율(%)</th> <th>비율량 (g)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>발효황칠추출물</td> <td>8.8</td> <td></td> <td>8</td> <td>고사포닌추출물</td> <td>0.1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>용매(물)</td> <td>8</td> <td></td> <td>9</td> <td>과당</td> <td>8</td> <td></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>다량추출물</td> <td>20</td> <td></td> <td>10</td> <td>포도당(이스트기질)</td> <td>0.2</td> <td></td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>황칠추출물</td> <td>2</td> <td></td> <td>11</td> <td>황칠추출물</td> <td>4.8</td> <td></td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>이소알콜용액</td> <td>84.2</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>올리고당</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>비타민C</td> <td>0.8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		No	성분명	비율(%)	비율량 (g)	No	성분명	비율(%)	비율량 (g)	1	발효황칠추출물	8.8		8	고사포닌추출물	0.1		2	용매(물)	8		9	과당	8		3	다량추출물	20		10	포도당(이스트기질)	0.2		4	황칠추출물	2		11	황칠추출물	4.8		5	이소알콜용액	84.2						6	올리고당	8						7	비타민C	0.8					
	No		성분명	비율(%)	비율량 (g)	No	성분명	비율(%)	비율량 (g)																																																									
	1		발효황칠추출물	8.8		8	고사포닌추출물	0.1																																																										
	2		용매(물)	8		9	과당	8																																																										
	3		다량추출물	20		10	포도당(이스트기질)	0.2																																																										
	4		황칠추출물	2		11	황칠추출물	4.8																																																										
	5		이소알콜용액	84.2																																																														
	6		올리고당	8																																																														
	7		비타민C	0.8																																																														
2. 비율순서 ①1차 : 약재추출물 먼저 넣는다 ②2차 : 과당 후 나머지 분량추출물 넣어 혼합한다. ③3차 : 80℃에서 80분이상 교반한다.																																																																		
1. 혼합물을 일정 시간까지 농축한다.	+농축기																																																																	
1. 농축된 혼합물을 살균한다. (온도 88℃에서 40분간)																																																																		
1. 살균된 농축액을 냉각한다.	+냉각기																																																																	
1. 농축액을 여과한다. (200 μm 파울러)																																																																		
1. 농축액용기를 이용하여 충전한다. (총량 240g) (충진속도 : 87℃이상)	+농축액용기																																																																	
1. 충전된 농축액을 건조한다. (공압인입, 투입 중)																																																																		
1. 충전된 농축액을 랩-키에이스-라복 용으로 포장한다. (용량이란 확인 후 일인스핀너 1일 부착)	(용량이란 24개/롤)																																																																	
1. 최종용기에 용하여 자가멸균사를 실시한다.																																																																		
1. 자가멸균설비에 혼합된 제품에 관하여 유효 유통 보증한다.																																																																		

<그림> 시제품 공정도

(2) 발효 황칠소재 유용물질의 기능성 규명

본 과제에서는 2세부과제와 연계하여 발효 황칠 소재의 기능성을 검증하였다.

① 항염증 활성물질의 기전 규명

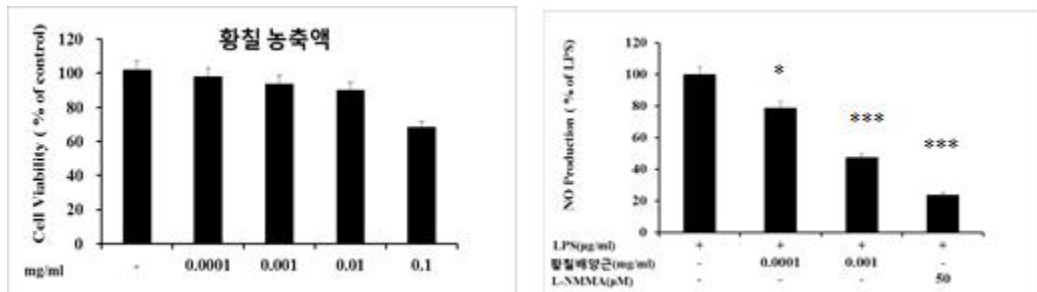
○ 세포주 및 재료

- 세포주 : RAW264.7 cell line
- 배지 : DMEM (high glucose)
- 시료 : 고사포닌이 함유된 황칠 열수추출물
- 양성대조군 : L-NMMA

○ Nitric Oxide 검출방법 : Cellculture시 상등 액만 취하여 NO detection kit (Intron, Seoul, Korea)를 이용하는 방법이다, 상등액 70 μl/well 넣고 그 후 NO kit안에 있는

시약인 N1 buffer 70 μ l/well 더한 뒤 10분 동안 상온에서 플레이트 shaker를 사용하였다. 그 후 N2buffer 70 μ l/well 더한 뒤 동일한 방법으로 10분 동안 보관 후 540nm 파장에서 측정하였다

○ 항염증 효과



<그림> 황칠 발효물의 항염증 효과

- 미생물을 이용한 고사포닌 발효 황칠 추출물은 항염증에 대해 효과가 우수하여, 앞으로 염증관련 질환 (위염, 대장염, 류마티스성 관절염 등) 과 면역증강의 건강기능성 식품의 소재로 활용될 가치가 높은 것으로 평가되었다

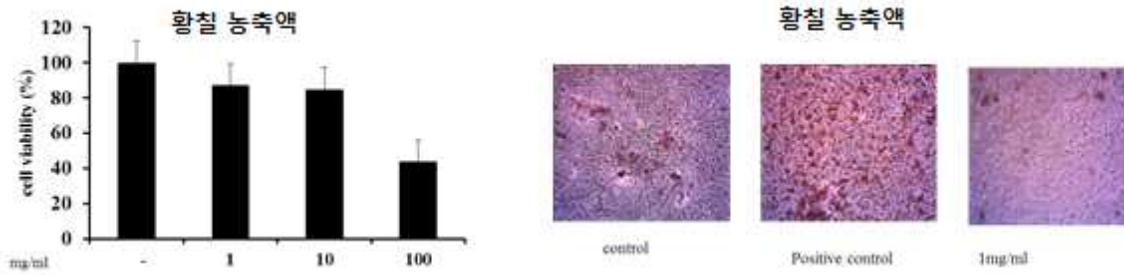
② 항비만 활성물질의 기전 규명

○ 세포주 및 재료

- 세포주 : 3T3-E1 cell line
- 배지 : DMEM
- 시료 : 고사포닌이 함유된 황칠 열수추출물

○ 3T3-L1 adipocyte 분화 및 Oil-Red 염색 cell 을 24 well plates에서 배양하였고, 세포를 분화시키기 전에 정확하게 호르몬 혼합액 (1uM dexamethason, 5ug/ml insulin, and ug/ml IBMX)을 처리하여 2일동안 분화를 유도하였다. 2일후에 5ug/ml insulin과 10% 우태아혈청이 포함된DMEM배지에서 8일동안 배양한 후에, 이분화된 세포에 고사포닌이 함유된 황칠추출물 을 처리하였다. 8일째에Oil-Red 염료로 염색을 하였다. 지방세포의 작은 지방체는 Red로 염색이 된다.

○ 항비만 효과



<그림> 황칠 발효물의 항비만 효과

- 세포실험을 통하여 지방세포로의 분화 억제 만 아니라 지방 합성 저해능이 우수한 것으로 확인되었다.

③ 미백효과

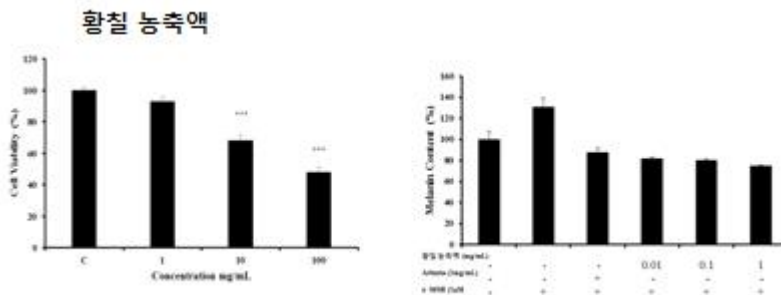
○ 세포주 및 재료

- 세포주 : B16B-L6 cell line
- 배지 : DMEM
- 시료 : 고사포닌이 함유된 황칠 열수추출물

○ α -MSH 자극에 의해 유도된 멜라닌 생성 억제 효과

Mouse melanoma B16 세포에 각 농도의 고사포닌이 함유된 황칠추출물과 1 nM 의 α -MSH를 3일 동안 처리하여 배지로 방출되는 멜라닌을 405 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다

○ 미백 효과

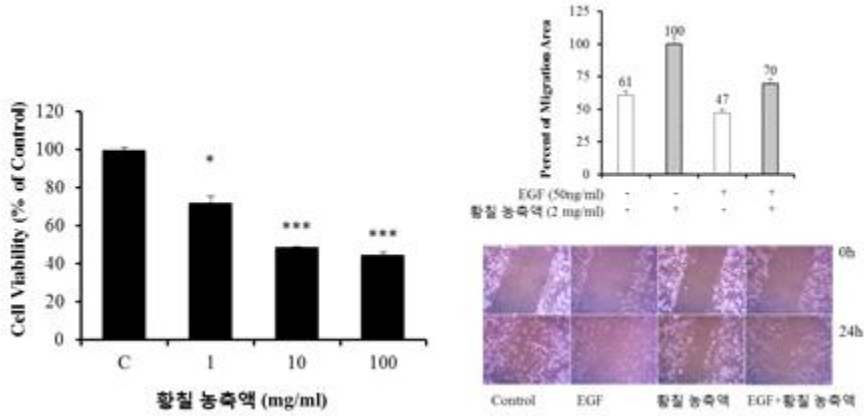


-미백활성도 우수하여, 이러한 연구 결과는 고사포닌이 함유된 황칠 추출물을 이용한 미백용 화장품 개발에 기여할 것으로 판단된다.

④ 암세포 증식억제효과 분석

- 세포주 및 재료
 - 세포주 : A549 cell line
 - 배지 : RPMI1640
 - 시료 : 고사포닌이 함유된 황칠 열수추출물

- 항암 효과



- Apoptosis 과정 유도인자를 확인하여, 항암효과를 확인하였으며, 고사포닌이 함유된 황칠 추출물이 건강기능성 식품개발을 위한 지표 물질로 활용 될 수 있을 것이다.

3. 개발 균주의 Probiotic 소재로의 활용을 위한 대량화 공정 개발

① Probiotic 생균제 시생산

유산균의 probiotic 원료 개발을 위한 Pilot 설비를 활용한 대량 배양 및 분말화 공정을 개발하고자 하였다.

I. 종균활성화

1. 종균보관 : -70°C Deep freezer
2. 활성화
 - 1) 보관중인 균주 glycerol stock vial 활성화
 - 2) 활성화배지 10ml MRS broth / 30ml test tube
 - 2) 배양조건 : 37°C, 12hr 정치배양

II. SEED 배양

1. 사용용기 : 3L 삼각 플라스크
2. 배양배지 : LFC broth media
3. 배양조건 : 37°C, 12hr 정치배양

III. 본배양

1. 30L, 500L 배양
 - 1) 배양액량 : 배양탱크 용량의 70%
 - 2) Feeding 배지
 - 3) 배양조건
 - ▷ 스팀으로 121°C, 20분 멸균
 - ▷ 37°C 냉각 후 seed 접종
 - ▷ 60rpm, 10hr 배양
 - ▷ 10hr부터 membrane 순환 시작
 - ▷ 17 ~ 18hr membrane 순환배양 종료
 - ▷ pH control 5.3유지

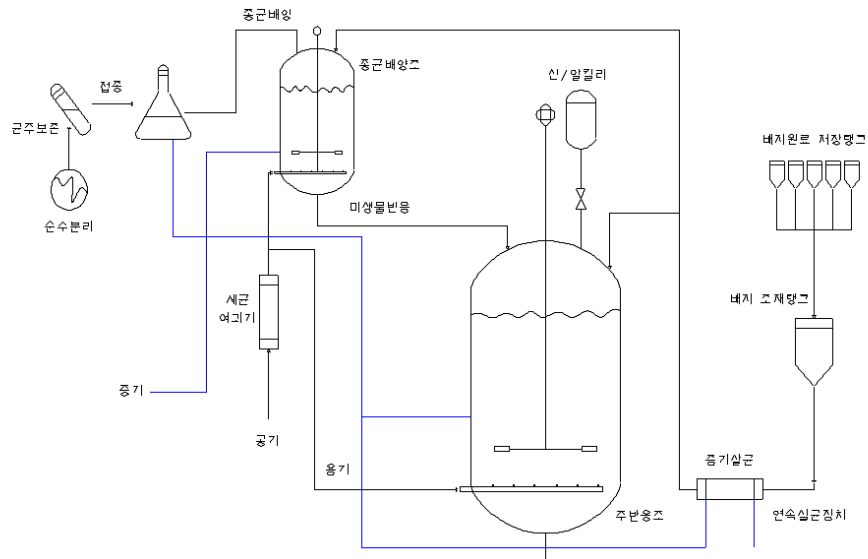


IV. 균체회수

1. 사용장비 : Tubular type centrifuge, Vertical mixer
2. 균체의 분리방법 : 원심분리 후 동결보호제 혼합
3. 원심분리 조건 : 15,000 ~ 18,500rpm, 1hr
4. 동결보호제혼합비 : 펠렛대비 50~100%

V. 동결건조 및 분쇄

1. 사용장비 : Freeze dryer, Pin Mill
2. 균체 처리방법 : -40°C 예비동결 → 동결건조 (-40~30°C) 72시간 → 분쇄기에서 분쇄
3. 동결보호제 : sucrose, 쌀가루, peptone, trehalose



<그림> 미생물 분말 생산 공정도

본 공정을 통한 생균수는 다음과 같이 확인 되었으며, 최종 공정 진행 후 10×10^{11} 의 생균수를 확인하였다.



공정명	생균(ctu/ml(g))	생균증가율
종균활성	1.0×10^9	
Seed 배양	$2 \sim 3.0 \times 10^9$	3
본배양	$8 \sim 20 \times 10^9$	8~20
균체회수	$7.5 \sim 10 \times 10^{11}$	750~1,000

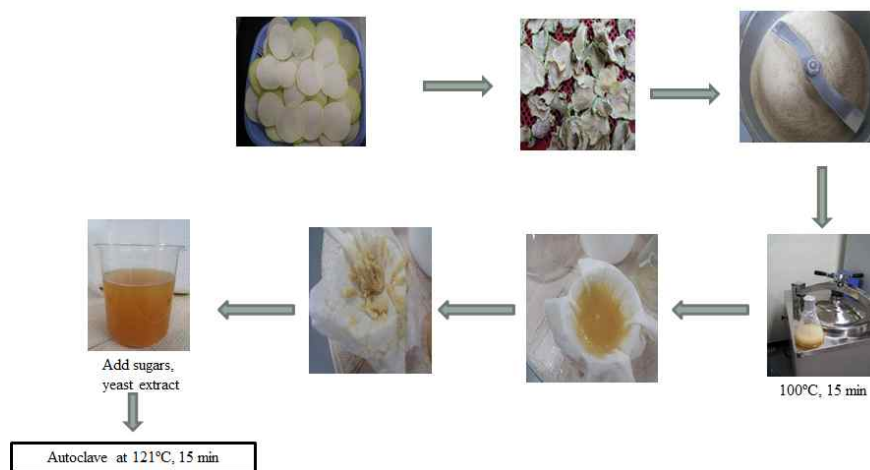
<그림> 대량 공정을 통한 생균제 시제품 생산

본 공정을 통한 생균수는 다음과 같이 확인 되었으며, 최종 공정 진행 후 10×10^{11} 의 생균을 분말화 하여 시제품을 생산하였다.

②균주의 대량 배양을 위한 천연 배지 조성의 확립

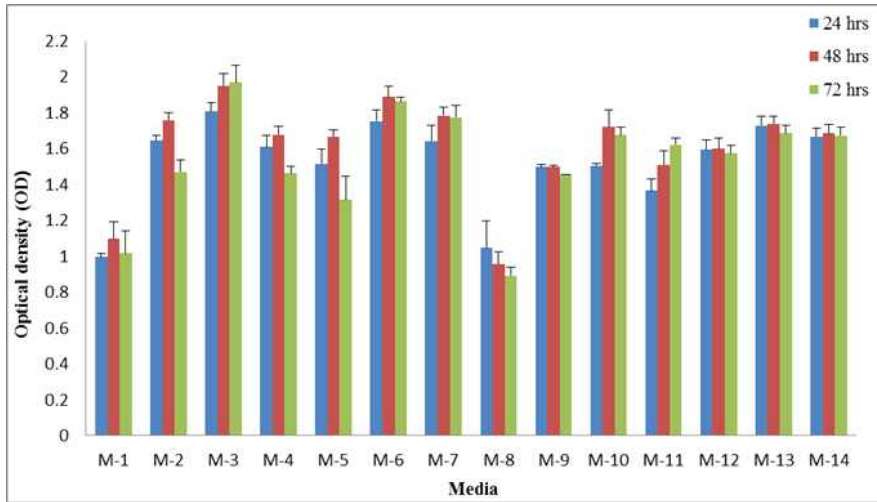
발효산물이 식품으로 사용하기 위해서는 합성원료나 무기염류의사용이 제한되고 있어서 본 연구는 천연 식품소재를 이용하여 probiotic Lactic acid bacteria를 배양하고자 하였고, 그중 일차적으로 조성된 천연배지에서의 생육을 조사한바 있다. 천연배지의 소재들 더욱 다양하고 사포닌 전환에 효과가 있는 보다 다양한 prebiotic의 개발이 절실히 요구 되고 있어 향후 실험에서 최적의 천연 배지 조성과 그에 따른 사포닌 전환 양상을 조사하고 효능에 미치는 영향도 조사하고자 하였다. 다양한 식품 소재를 이용한 농도 구성를 달리하여 분리균주 및 유사유산균의 생장을 조사한 결과최적의 식품 소재 천연재료의 구성비를 제시하였고 이를 통한 사포닌 전환능 또한 조사하였다.

- Radish, cabbage, sugars, yeast extract



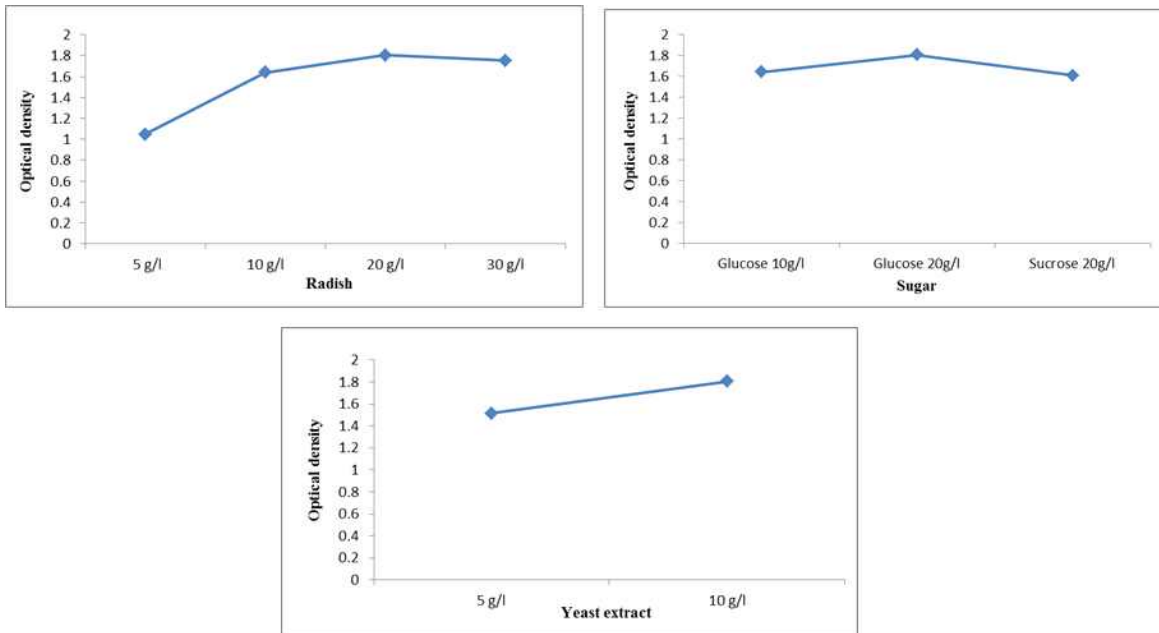
<그림> 천연 배지의 이용

Medium Nutrient supplementation	
1	Raddish (20 g/l)
2	Raddish (20 g/l), Glucose (10 g/l), Yeast extract (10 g/l)
3	Raddish (20 g/l), Glucose (20 g/l), Yeast extract (10 g/l)
4	Raddish (20 g/l), Sucrose (20 g/l), Yeast extract (10 g/l)
5	Raddish (20 g/l), Glucose (20 g/l), Yeast extract (5 g/l)
6	Raddish (30 g/l), Glucose (20 g/l), Yeast extract (10 g/l)
7	Raddish (10 g/l), Glucose (20 g/l), Yeast extract (10 g/l)
8	Raddish (5 g/l), Glucose (20 g/l), Yeast extract (10 g/l)
9	Cabbage (5 g/l), Glucose (20 g/l), Yeast extract (10 g/l)
10	Cabbage (10 g/l), Glucose (20 g/l), Yeast extract (10 g/l)
11	Cabbage (20 g/l), Glucose (20 g/l), Yeast extract (10 g/l)
12	Raddish (5 g/l), Cabbage (5 g/l), Glucose (20 g/l), Yeast extract (10 g/l)
13	Raddish (10 g/l), Cabbage (10 g/l), Glucose (20 g/l), Yeast extract (10 g/l)
14	Raddish (10 g/l), Cabbage (5 g/l), Glucose (20 g/l), Yeast extract (10 g/l)

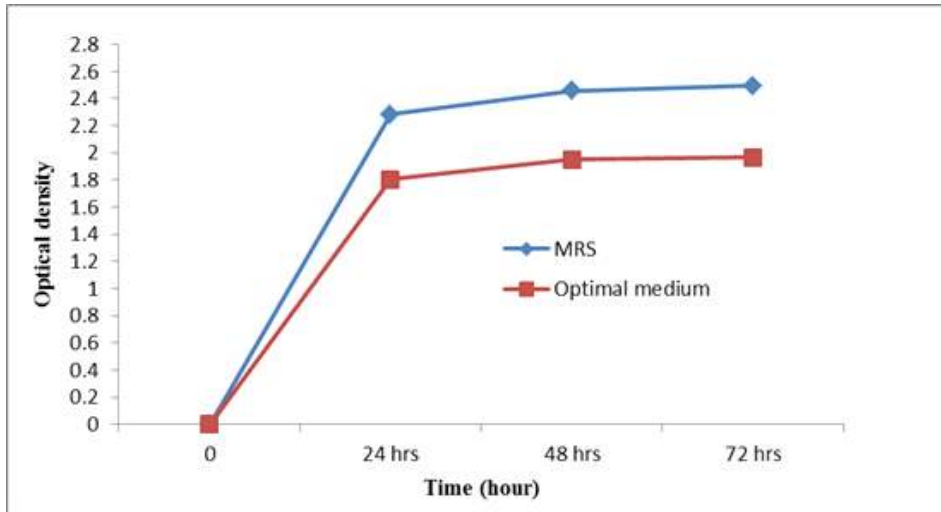


<그림> 천연 배지를 활용한 균주의 성장량 측정

천연 배지는 무와 glucose, yeast extract를 원료로 하여 균주를 성장 시키고자 하였다. 각 배지의 조합에 따라 위와 같이 균주의 성장량을 확인할 수 있었으며, 균주의 성장에 각 원료들이 미치는 영향을 조사하기 위하여 아래와 같이 각 조성별로 균주의 성장에 미치는 영향을 추가적으로 조사해 본 바, 무 20g, glucose 10g, yeast extract 10g이 들어간 조성이 본 균주의 성장에 있어서 가장 적합할 것으로 판단되었다.



<그림> 성분별 균주의 성장량 측정



<그림> 천연 배지와 기존 MRS 배지간의 균주 성장량 분석

현재 유산균 배지인 MRS배지와 천연배지와와의 성장량 비교분석을 수행 한 결과 위와 같이 MRS 배지에 비하여는 낮은 성장량을 가지고 있지만, 생장에 있어서는 큰 문제가 없을 것으로 판단되었다.

현재 MRS배지는 매우 고가로 수입되는 것을 사용하고 있다. 본 실험은 국내에서 흔하고 값싸게 구입하여 실시할 수 있는 장점이 있으며 식품으로 사용하지 못하는 MRS에 비해 식품으로 사용할 수 있는 식재료를 이용한 경우 경제적이면서도 상업화가 가능한 배지 로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 본 내용을 기초로 유산균이 최적으로 성장할수 있는 천연배지를 소개하고 이를 scale up 할 경우 그 경제적 가치는 더 높이 평가될 것으로 사료된다.

7절. 한국형 미생물을 활용한 화장품 소재 개발

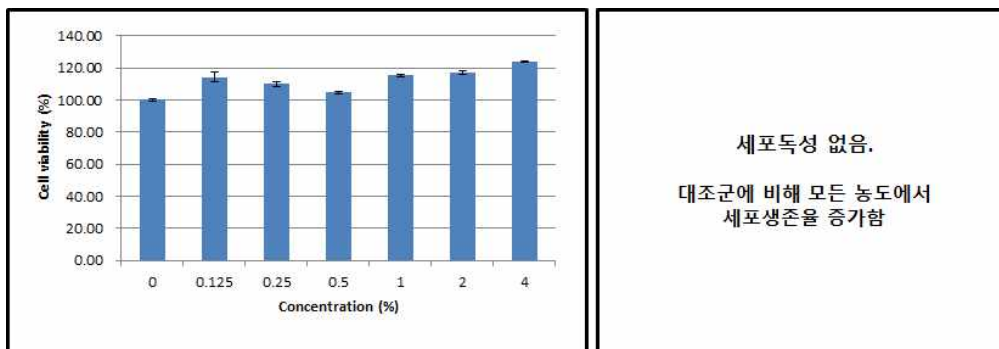
1. 미생물 발효 배양물 원료화(제품화)

본 연구 팀에서는 선행 연구 및 새롭게 분리한 유산균주 총 4종의 균주 자체의 활성과 균주를 이용해 개발된 인삼 발효물을 이용하여 효능 활성을 확인 하였다. 균주배양물을 동결건조화 하여 이를 활성 평가 시료로 이용하였다.

(1) 한국형 유산균의 세포독성 평가

RAW264.7을 헤마사이토미터(Hemocytometer)를 이용하여 96well plate에 1.5 x 10⁴ cell/well 씩 동일하게 계수하여 분주한 후, 37℃에서 5%의 이산화탄소 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양한 세포 배양액을 제거하였다. 추출물을 각 농도별씩 40 μl를 취하여 DMEM 배지와 혼합한 뒤, 각 well에 농도별로 처리하였다. 이를 다시 37℃에서 5%의 이산화탄소 조건으로 CO₂ incubator에 넣어 24시간 배양하였다. 그 후 well당 10% WST(high sensitive Water Soluble Tetrazolium salt)를 100 μl씩 첨가하고 동일한 조건에서 2시간 동안 반응 시켜주었다. 2시간 뒤, ELISA reader(Thermo, Multiskan EX)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

Lactobacillus panaxibrevis strain DCY65

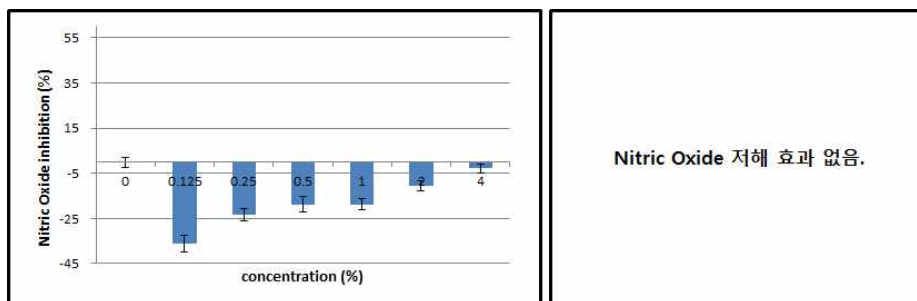


<그림> DCY65균주의 세포독성 시험결과

세포 독성 확인 결과 모든 농도에서 세포독성이 없는 것으로 확인 되어 고농도에서도 안전하게 사용할 수 있을 것으로 확인 된 바 추가적인 활성 연구를 진행하였다.

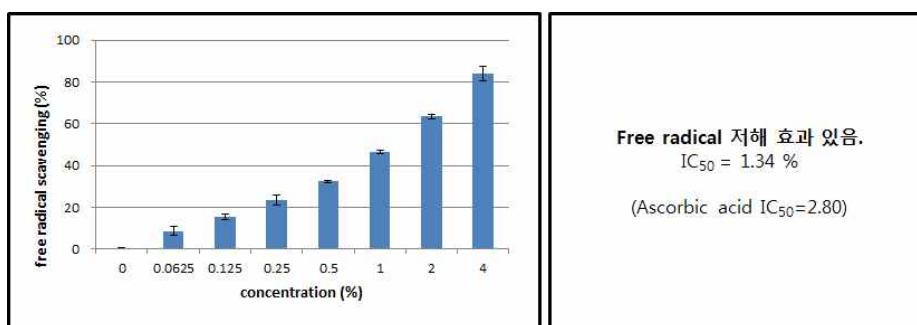
(2) 한국형 유산균의 염증 억제활성 평가

한국형 유산균의 염증 억제활성을 평가하기 위하여 NO활성을 확인 하였다. 발효물을 12.5 ~ 100ug/ml의 농도로 RAW264.7 세포에 처리하여 nitric oxide 생성 억제율을 측정하였다. Nitrite assay는 NO생성 양을 측정하는 방법으로 다음과 같이 측정하였다. 배양된 세포를 4×10^5 cells/well 수준으로 24 well plate에 1 mL씩 배양한 다음 24시간 동안 배양하고, 24시간 후 medium 을 제거한 후 RPMI 1640으로 희석된 각 농도별 시료 처리 후 LPS ($1 \mu\text{g/mL}$)를 처리하여 24시간 후 세포에서 medium으로 분비되어 나온 NO의 양을 Griess 시약 [0.1% (w/v)N-(1-naphthyl)-ethylenedia mine and 1% (w/v) sulfanilamide in 5%(v/v) phosphoric acid]을 사용하여 반응하였다. 반응 후 ELISA micro plate reader(Bio Rad Laboratories Inc., USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다. NO 생성억제 효과는 분리된 추출물을 농도별로 처리 후 LPS를 처리하여 측정된 실험군의 흡광도 값에서 LPS를 처리하지 않은 대조군과의 흡광도 값의 차이를 구하여 계산하였으며 처리 농도에 상관없이 모두 NO억제 효과가 없는 것으로 확인되었다.



<그림> DCY65균주의 NO억제 효과

DPPH의 소거 실험을 통해 한국형 신규 유산균 배양물의 항산화 실험을 진행 하였다.

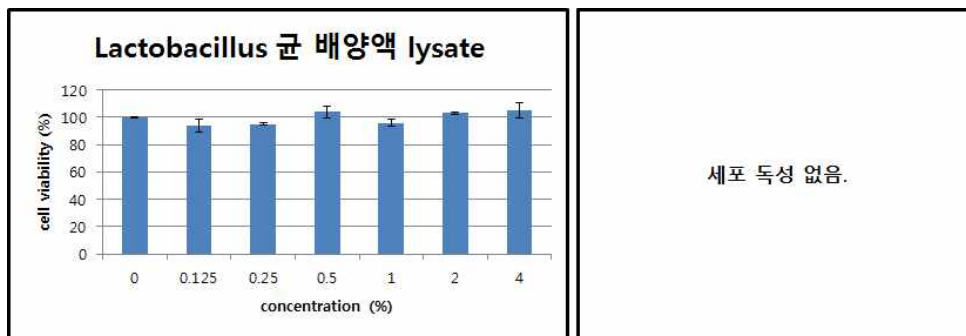


<그림> DCY65균주의 항산화 효과

실험결과높은 항산화 활성을 보이는 것으로 확인 되었다. 비교적 낮은 IC50값을 가지고 있어 추후 항산화 관련된 제품 개발 등에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단 되어진 다.

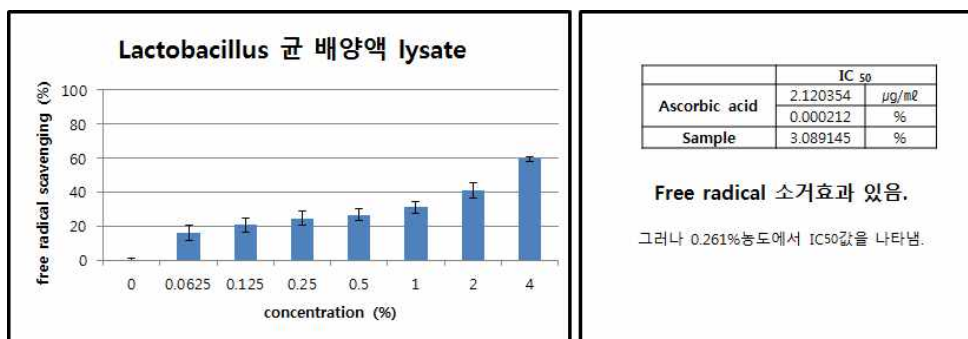
(3) *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65 균주 Lysate를 활용한 제품 개발

본 균주는 화장품 소재로서 이용할 수 있는 뛰어난 활성을 가지는 것을 확인 하였다. 이에 본 연구에서는 이의 효능 활성을 활용한 화장품 원료소재를 개발하고자 하였다. DCY65 균주를 배양한 lysate를 추출하고 이의 활성을 검정하였다.



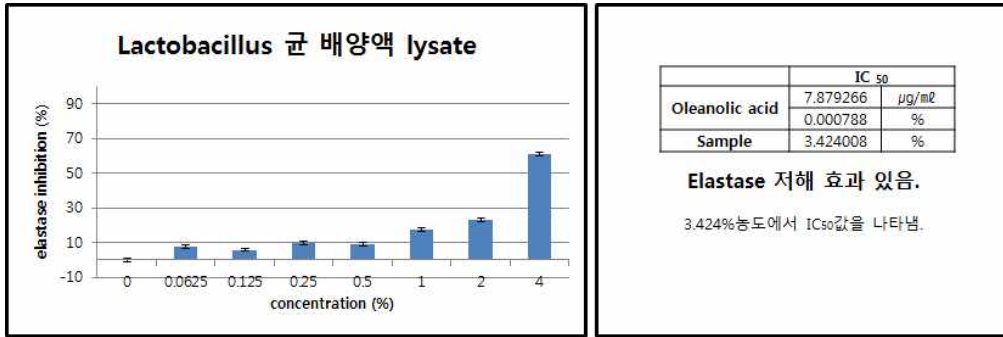
<그림> *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65 배양 lysate의 세포독성 확인

Raw 264.7 cell에 lysate를 농도별로 처리한 후 세포독성을 확인해 본 결과 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않아 안전한 원료임을 확인하였다.



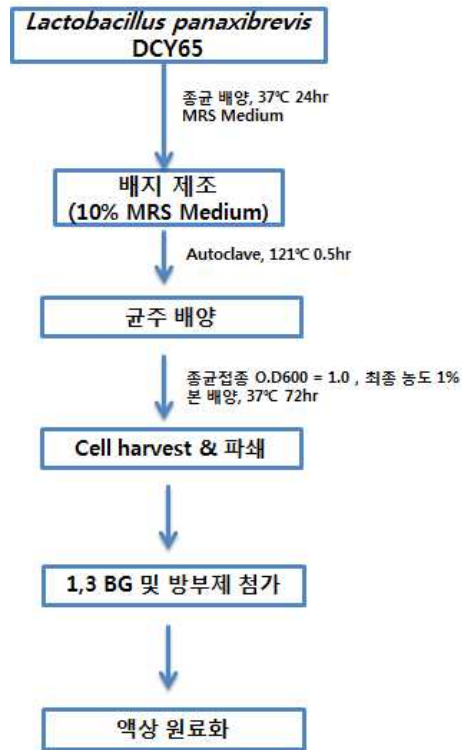
<그림> *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65 배양 lysate의 항산화 활성

DPPH 소거 활성검정을 통한 항산화 활성의 검정 결과 높은 항산화 활성을 가지는 것을 확인 할 수 있었다. 특히, 비교적 낮은 농도에서도 IC₅₀값을 가지는 것을 확인 할 수 있어 항산화 소재로서도 가치가 높을 것으로 기대되었다.



<그림> *Lactobacillus panaxibrevi* DCY65 배양 lysate의 항주름활성

균 Lysate의 elastase 억제 활성 검정 결과 약 3.4%에서 IC₅₀값을 나타냈으며 이는 균주의 lysate가 항주름 효과를 가지는 것을 의미한다. 이처럼 본 한국형 미생물 *Lactobacillus panaxibrevi* DCY65의 lysate의 경우 세포독성이 없이 안정하고 항산화 및 항주름 효과를 가지고 있는 것으로 확인 된 바 화장품 소재로서도 이용가치가 높을 것으로 예상되어 이를 활용한 원료화를 진행하였다.



<그림> *Lactobacillus panaxibrevi* DCY65 배양 lysate의 원료화 공정도



<그림> *Lactobacillus panaxibreviis* DCY65 배양 lysate의 원료화 시제품 샘플

#309, Tower-Dong, Heungdeok IT Valley, 13, Heungdeok 1-Ro, Giheung-Gu,
Yongin-City, Gyeonggi-Do, 446-908 South Korea www.gfcs.co.kr
Phone +82-70-4192-9366 Fax +82-31-264-9366



Version : a

Certificate of Analysis

Product Name	Lactobacillus panaxibreviis lysate
INCI Name EU(PCPC)	Lactobacillus sp.
Lot No.	AL1333JN
Manufactured Date	10. May. 2015
Analysis Date	15. May. 2015
Expired Date	09. Dec. 2016

Analytical Tests	Specifications	Results
Appearance	Clear dark red liquid	Pass
Odor	Slightly characteristic odor	Pass
pH(25℃)	3.00 ~ 5.00	4.26
Specific Gravity(25℃)	0.900 ~ 1.030 g/ml	1.008
Refractive Index(25℃)	1.200 ~ 1.400	1.370
Heavy metals		
-Total	≤ 10ppm	Pass
-Arsenic	≤ 1ppm	Pass
Microbes		
-total viable aerobic count	≤ 100cfu/g	Pass
-fungi : yeasts and moulds	≤ 100cfu/g	Pass
-Pathogens	Absent	N.D

N.D: Not detection

Storage : Store the product in the original, well closed container, in a cool, dry area and protected from light.

Shelf life : 24 months from MFG

H. C Kang

Director Hee Cheol Kang
R&D Center

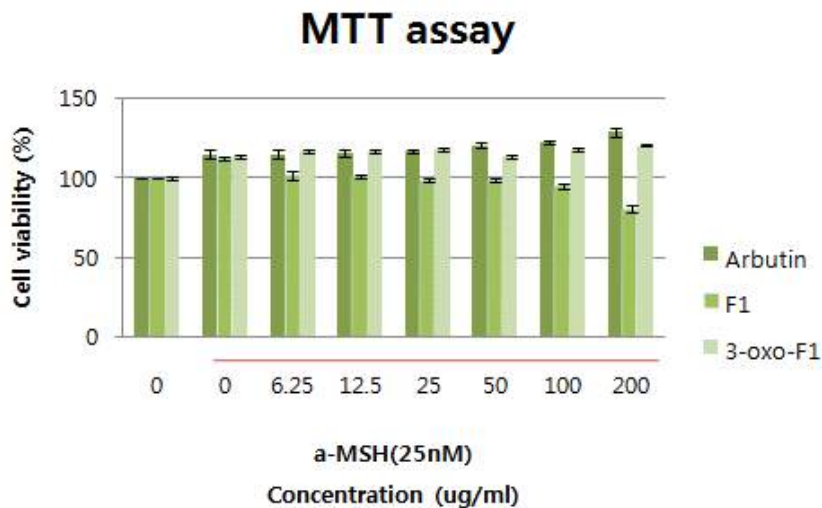
<그림> *Lactobacillus panaxibreviis* DCY65 배양 lysate의 원료화 시제품 COA

2. 한국형 미생물 DCY65로부터 생성된 신규 사포닌의 화장품 소재 효능 검증

(1) 세포독성 시험

세포실험을 하기 전, 버섯티로시나아제를 이용하여 저해활성을 확인하였다. C-K와 3-oxo-CK는 저해 활성이 없었고, F1과 3-oxo-F1 저해 활성이 있었다. 결과를 참고하여 세포실험을 진행하였다

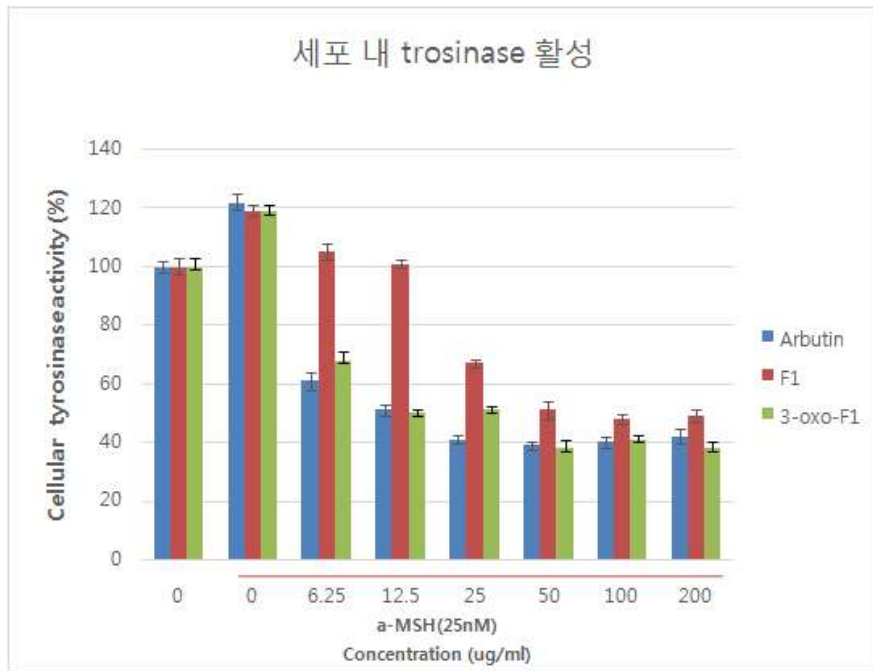
F1과 3-oxo-F1이 세포 독성에 미치는 농도를 조사하여 미백 실험에 사용될 농도 범위 결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. B16 melanoma 세포에 대한 세포독성을 측정한 결과, 여러 농도로 처리 시 세포 생존율이 영향을 주지 않는 것을 미루어 보아, F1에 비해 세포독성이 없는 것을 확인 할 수 있었다.



<그림> Relative cell viability of F1, 3-oxo-F1, albutin on B16 melanoma cells by MTT assay. The cells were treated with various concentration

(2) 세포내 tyrosinase 억제 활성 시험

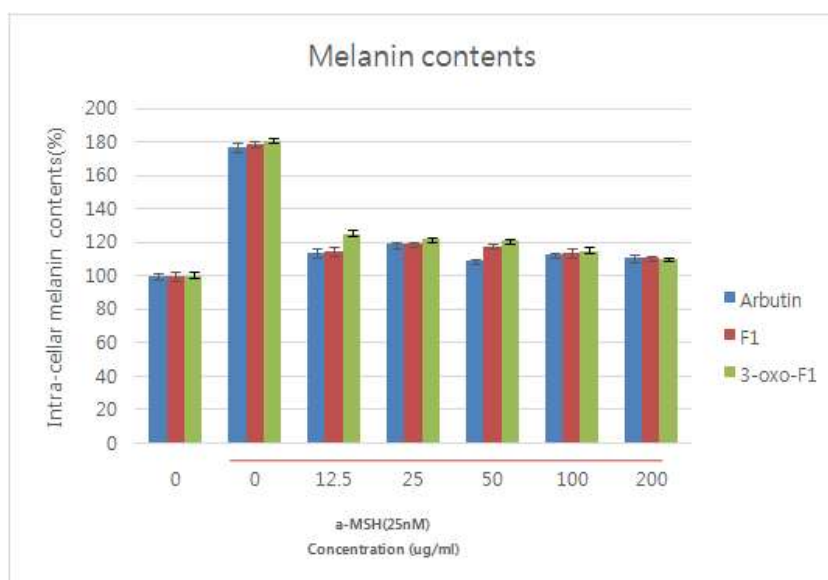
멜라닌 합성은 tyrosinase에 의해 조절되는 일련의 효소적 반응에 의해 조절되며, tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고 다시 dopaquinone으로 산화시키는 연속적인 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이루어진다고 알려져 있다. 멜라닌 생성에 관련하는 세포내 tyrosinase의 활성 저해효과를 측정하였다. Fig. 26의 결과와 같이 F1에 비해 3-oxo-F1을 처리한 실험군에서는 농도 비 의존적으로 tyrosinase의 활성이 저해되었으며, 전체적으로 tyrosinase 활성을 저해 효과가 있는 것으로 나타났다.



<그림> Effect of F1, 3-oxo-F1, albutin on tyrosinase activity in B16 melanoma cells. The cells were incubated with SSE for 24 h. Results are means \pm S.D. from 3 separate experiments. Arbutin (200, 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 μ g/ml).

(3) 멜라닌 생성량 측정

F1과 3-oxo-F1이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16 melanoma 세포를 이용하여 멜라닌 생성 저해 효과를 측정하였다. 준비된 세포에 농도별로 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 세포수를 수집하여 멜라닌 양을 측정한 결과, 둘 F1과 3-oxo-F1 처리군 모두가 농도에 관계없이 멜라닌 합성이 저해되었으며 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 약 60% 멜라닌 생성저해효과가 있었다(Fig. 27). 또한 멜라닌 합성 억제효과를 육안으로 관찰하기 위하여 각 시료 당 1×10^6 개의 세포를 수집하여 관찰하였다. 대조군으로서 멜라닌 생성을 촉진시키는 호르몬인 α -MSH를 처리한 세포군에서는 멜라닌이 상당히 증가되었음을 확인하였다. F1과 3-oxo-F1 처리군은 대조군보다 멜라닌 색소가 감소하였다.



<그림> Inhibitory effect of F1, 3-oxo-F1, albutin on melanin accumulation in cultured B16 melanoma cells. Cells were cultured for 48 h in medium containing 200,100, 50, 25,12.5,6.25 $\mu\text{g/ml}$ of compounds. Picture of cellular melanin solubilized with 2 M NaOH. Arbutin (200,100,50,25,12.5 and 6.25 $\mu\text{g/ml}$).

3. 발효 홍삼 비고시 기능성 소재 개발

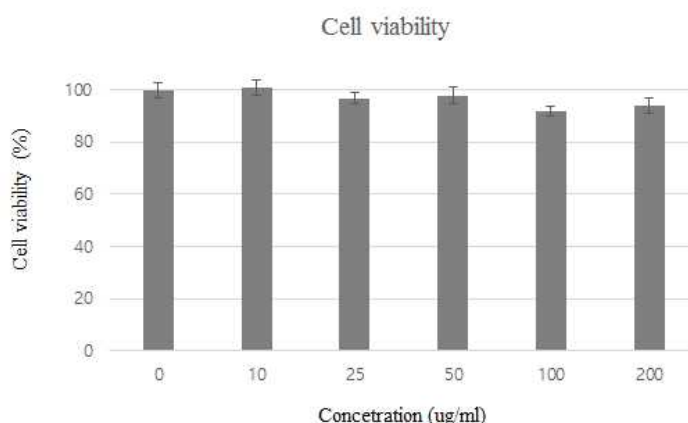
가. 균주를 이용한 발효 확인

1세부 과제 및 3협동 과제로부터 확립된 부턴 전달받은 *Lactobacillus panaxibrevi*s DCY65 균주와 인삼추출물을 발효 시킨 농축물을 받아 실험에 진행 하였으며, 이를 활용하여 식약처 비고시 기능성 등록을 위해 in vitro 효능 평가를 진행 하였으며 임상시험을 위한 크림 시제품을 샘플을 제조 하였다.

나. in vitro 효능 시험

① 세포독성 평가

인삼 발효 추출물의 세포 독성을 측정하였다. 추출물에 대한 세포독성을 알아보기 위하여, 인간 각질형성 세포 HaCat(ACTT, CLS 300493, USA)을 헤마사이토미터(Hemocytometer)를 이용하여 96well plate에 1.5×10^4 cell/well 씩 동일하게 계수하여 분주한 후, 37°C에서 5%의 이산화탄소 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양한 세포 배양액을 제거하였다. 인삼 발효 추출물을 농도별로 희석하여, 각 농도별씩 40 μ l를 취하여 DMEM 배지와 혼합한 뒤, 각 well에 농도별로 처리하였다. 이를 다시 37°C에서 5%의 이산화탄소 조건으로 CO₂ incubator에 넣어 24시간 배양하였다. 그 후 well당 10% WST(high sensitive Water Soluble Tetrazolium salt)를 100 μ l씩 첨가하고 동일한 조건에서 2시간 동안 반응 시켜주었다. 2시간 뒤, ELISA reader(Thermo, Multiskan EX)를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

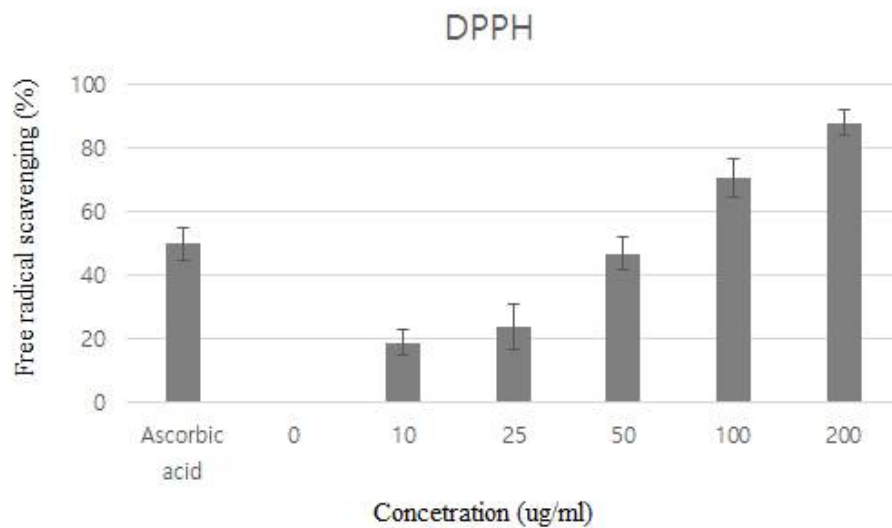


<그림>. 인삼 발효 추출물의 피부세포 독성 결과.

위의 나타난 바와 같이 인삼 발효 추출물의 사용 농도가 실험 한 모든 농도에서 독성이 없는 안전한 원료로 사용이 가능함을 확인하였다.

② 항산화 효과 시험

인삼 발효 추출물에 대한 항산화 효과를 알아보기 위하여, 구체적으로 얻어진 발효 추출물을 다양한 농도로 희석하여 시료를 준비한 후, 이들 시료 50 μ l와 100 μ M DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 450 μ l를 혼합하고 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응시킨 후, 96well plate에 담아 DPPH 양을 Multi reader기를 이용하여 520nm에서 측정하였다. 그리고 positive control로서 ascorbic acid 3ug/ml을 활용하였으며, 시료를 넣지 않은 경우를 대조군으로 하여 시료의 자유라디칼 소거 활성(Free radical scavenging activity, %)을 계산하였다.



<그림> 인삼 발효 추출물의 항산화(DPPH) 시험 결과.

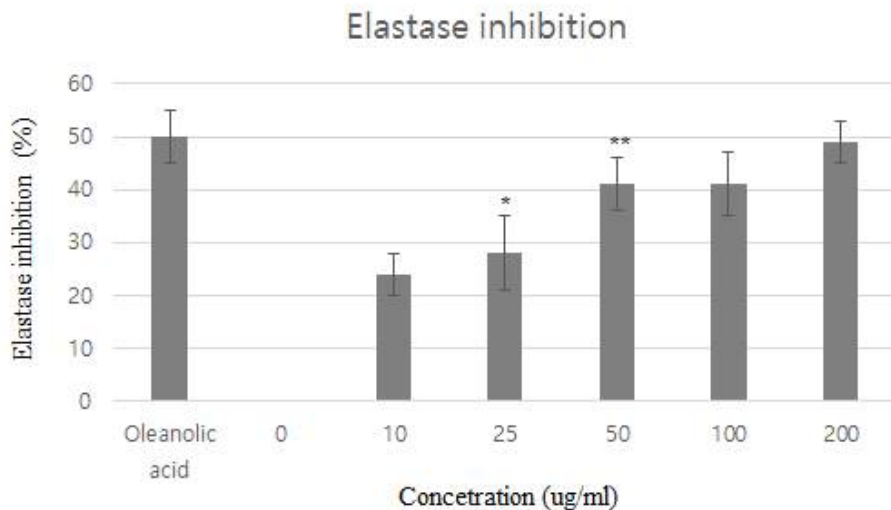
인삼 발효 추출물을 농도별로 처리 하였을 때 유의성있는 DPPH 소거능을 나타내어 높은 항산화 활성을 나타내었다.

③ 주름 억제 효과 시험

엘라스타제(Elastase)는 진피 내 피부탄력을 유지시키는 데 중요한 기질인 elastin을 분해하는 효소이다. 또한 elastase는 다른 중요한 기질단백질인 collagen을 분해할 수 있는 비특이적 가수분해 효소이다. 따라서 elastase 저해제는 피부 주름을 개선하는 작용을 한다고 볼 수 있다.

Elastase는 동물 결합 조직의 불용성 탄성 섬유 단백질인 elastin을 분해시켜 피부의 진피조직의 그물망 구조 결합을 끊어줌으로서 주름생성의 주원인인 효소로 알려져 있다. 피부의 진피 조직 속에는 collagen과 피부의 탄력성에 관련된 elastin이 그물망 구조를 형성하고 있는데, 이러한 그물망 구조가 깨어지면서 즉 elastin이 elastase에 의해 분해되어 피부가 처지고 주름이 생기므로 내인성 피부노화가 발생한다. 그러므로 피부노화의 주원인 중의 하나인 elastin 분해효소인 elastase의 활성을 저하시킴으로서 피부노화를 억제할 수 있다.

인삼 열매 발효 추출물을 다양한 농도로 희석하여 시료를 40 μ l을 E-tube에 취하고, 10mM Tris-HCl buffer(pH8.0)에 녹인 N-succinyl-(Ala)3-p-nitroanilide (S4760, Sigma) 1.6 mM 농도의 기질 200 μ l를 가한 후, 10mM Tris-HCl buffer(pH8.0)에 녹인 Elastase from porcine pancreas Type IV (E0258, Sigma) 0.4U/mL의 효소를 40 μ l 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 반응한 후 Multi-reader기를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

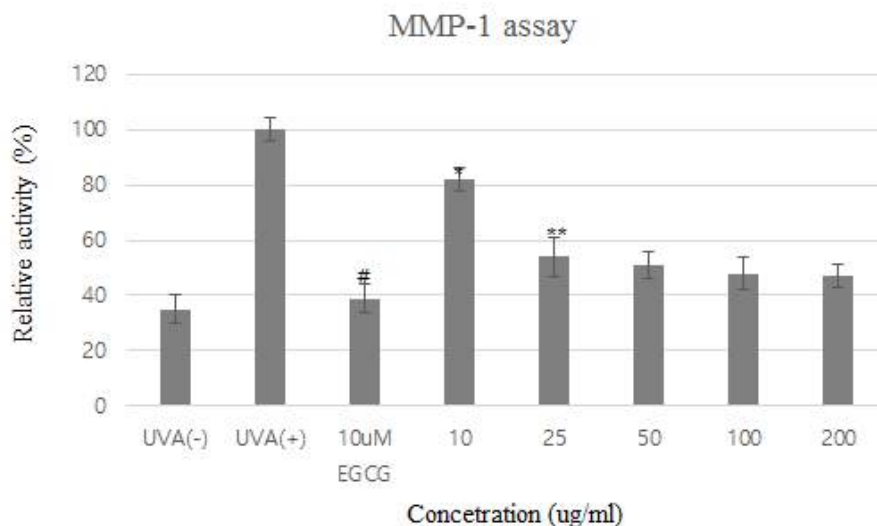


<그림> 인삼 발효 추출물의 Elastase 저해 효과 시험 결과.

농도별로 처리 하였을때 유의성있는 엘라스타아제(Elastase) 억제율을 나타내어 피부 주름개선 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

④ MMP-1 Assay 이용한 주름 억제 효과 시험

인삼 발효 추출물의 주름 억제 활성을 확인하기 위하여, MMP-1에 대한 assay 실험을 진행하였다. UVA의 조사에 의하여 발현되는 MMP-1의 억제 활성을 Real-time PCR을 통하여 확인 하였으며, 인삼 열매 발효 추출물을 0~200ug/ml로 농도로 조제하여 처리함으로써 MMP-1의 억제 활성에 영향을 주는지 확인하였다



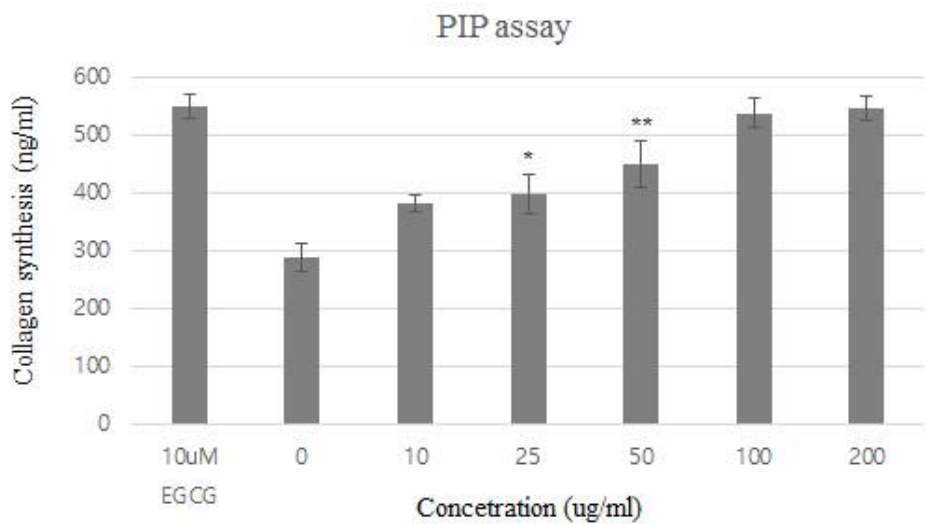
<그림> 발효 인삼의 MMP-1억제 활성.

그 결과, 인삼 추출물의 발효 전·후 비교시 발효를 통한 샘플이 MMP-1 억제 활성이 보다 뛰어난 것을 확인 할 수 있었다.

⑤ Procollagen Type I C-peptide(PIP) Assay

Collagen들은 세포내에서 Procollagen이라는 전구물질로 합성된 후 세포외로 분비되어 collagen 섬유로 중합된다. procollagen은 아미노 말단과 카르복시 말단에 프로펩티드라는 펩티드염기서열을 포함하고, 프로펩티드는 endopeptidase에 의해 분리된다.

본 실험에서 시료가 인체 진피 섬유아세포의 procollagen 합성에 미치는 영향을 조사하였다. 인삼 발효 추출물을 hFF 세포에 각각의 농도로 처리하고 24시간 배양 후 Procollagen Type I C-peptide(PIP) kit인 96well plate에 각각 농도별로 처리한 배양액을 100 μ l씩 분주해주고 37 $^{\circ}$ C incubator에 넣고 2시간동안 반응시켜주었다. 그리고 D-PBS로 세척해준 뒤, antibody-POD conjugate solution을 각각 100 μ l씩 분주해주고 37 $^{\circ}$ C incubator에 넣고 1시간동안 반응시켜주었다. 다시 D-PBS로 세척해준 뒤, substratesolution (3,3',5,5'- Tetrametyl benzidine)을 각각 100 μ l씩 분주해주고 상온에서 15분간 반응시켜주었다. 15분 뒤, multi-reader기를 이용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. procollagen양을 조사한 결과는 아래의 그림과 같다.



<그림> 발효 인삼의 콜라겐 생성 활성화.

인삼 발효를 통한 샘플이 collagen 생합성에도 훨씬 높은 콜라겐 생성 활성을 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 처리 전보다 약 2배에 가까운 콜라겐 생합성 활성을 가지는 것을 확인 할 수 있었다.

October 13, 2015

Mr. Michael Kang

RE: Application No. 1-05-2015-3664

Dear Mr. Michael Kang:

In reference to the INCI application noted above, the International Cosmetic Ingredient Nomenclature Committee (INC) has completed its review of your request. The INCI name assigned to the trade name identified in this application is detailed on the attachment.

Please note, the attachment lists information from your application as it appears in our data base and will be published in the *International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook*, the web-based Dictionary *wINCI*, and the Council's On-Line *INFOBASE*. If your application indicates the trade name is "not for publication," it is noted on the attachment and the data will not be published.

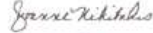
It is important to carefully check the attachment for accuracy and respond to our office promptly with any changes. The INCI name assignment and related company information will be retained in our data base unless we are notified that the product is no longer manufactured. You will be contacted on an approximate annual basis to update the current status of your company listings. This communication will include only trade names and addresses; therefore it is imperative that you maintain accurate records of all INCI name assignments.

To petition for a change in an INCI name assignment, a request to the INC can be sent via email to my attention. The petition should include the current INCI name, trade name, application number, requested revision, and technical rationale to support the petition, e.g., supporting composition information, and/or manufacturing details, and analytical data where appropriate.

In addition, please be advised that INCI names are continually reviewed by the INC for accuracy, and may be subject to change when deemed necessary.

Should you have any questions, please don't hesitate to contact me for further information.

Sincerely,



Joanne M. Nikitakis
Director, Cosmetic Chemistry
nikitakis@personalcarecouncil.org
Enclosure

<그림> 인삼 발효물의 국제 화장품 원료 ICID (CTFA) 등재 서류

4. 임상을 통한 기능성 확인

본 연구를 통하여 확보된 인삼 발효 추출물을 이용하여 실제 크림에 적용하고 이의 안정성과 효능을 평가하고자 하였다. 인삼 발효 추출물을 이용하여 제형에 적용되었을 때 저장 기간에 따라 인삼 ginsenoside의 분해 등의 변화가 있는지 안정성을 검사 한 결과 6개월 까지 제형이 안정한 것을 확인하였다.

<표> 임상시험용 시제품의 처방

	Trade Name	INCI	함량%
A	MYRJ52S	PEG-40 Stearate	0.60
	Rheodol AS-10	Sorbitan Strearate	0.60
	GMS 105	glyceryl Strearate	2.00
	Rheodol MS-165	Glyceryl strearate/PEG-100 stearate	2.00
	Kalcol 6870	Cetearyl alcohol	1.40
	Stearic acid	Stearic acid	2.00
	C.E.H	Cetyl Ethyl Hexanoate	6.00
	Rheodol AO-15	Sorbitan sequioleate	3.00
	Vitamin E acetate	Tocopheryl Acetate	0.05
Soya SPL-75H	Hydrogenated soybean Lecthin	0.10	
A-1	KF-96-10CS	Dimethicone	3.00
B	D.I Water	Water	46.00
	D-EDTA	EDTA	0.05
	1.3-Butylene glycol	Butylene glycol	3.00
	Glycerin	Glycerin	2.00
	1% sodium hyaluronate	Sodium hyaluronate	5.00
C	1% carbopol	Carbomer	20.00
D	D.I water	Water	2.00
	T.E.A	Trietanolamine	0.20
E	인삼 발효 추출물		1.00

위의 표에 따른 임상시험용 화장품(크림타입)의 시제품을 제조하였으며, 이때의 인삼 발효물은 3협동 기관에서 대량 생산한 발효 인삼 농축물을 활용하였다.



<그림> 임상시험용 크림 시제품의 생산

본 연구에서는 위의 크림을 이용하여, 개발된 인삼 발효물에 대한 주름 개선에 대한 비고시 기능성을 식약처로부터 인증받을 계획이며 이를 위하여 3차년도에 주름개선 및 피부 안정성을 위한 임상시험을 실시하였다.

가. 피부 자극테스트

인삼발효물을 함유한 크림을 8시간 동안 피부에 첩포 후 각각 30분, 24시간, 48시간 경과 후 시험부위의 피부자극 여부를 판정하였으며 일차 자극 테스트 결과 피험자 모두 피부자극을 나타내지 않았으며, 이는 ‘무자극’ 물질로 판단된 것을 확인 할 수 있었다.

IO-6106-A

SMC-170303-6071

(주)지에프씨
“락토바실러스/인삼발효여과물 함유크림”의
피부 첩포 안전성 평가
인체적용시험 결과보고서

2017년 03월 03일



<그림> 임상 안정성 평가

Table 5. 첩포시험(Patch Test) 결과

No.	Initial	제품명 닥트마실러스/인삼발효여과물 함유크림		
		30분 후	24시간 후	48시간 후
1	JYS	-	-	-
2	MIS	-	-	-
3	JOS	-	-	-
4	JSY	-	-	-
5	KSH	-	-	-
6	LGM	-	-	-
7	KSJ	-	-	-
8	LSJ	-	-	-
9	KJW	-	-	-
10	IYS	-	-	-
11	KSB	-	-	-
12	JEJ	-	-	-
13	JMS	-	-	-
14	YJO	-	-	-
15	YJW	-	-	-
16	JMR	-	-	-
17	HSH	-	-	-
18	PYO	-	-	-
19	KSM	-	-	-
20	PHJ	-	-	-
21	CJN	-	-	-
22	KRA	-	-	-
23	KYJ-1	-	-	-
24	YYT	-	-	-
25	HGS	-	-	-
26	KYJ-2	-	-	-
27	PSY	-	-	-
28	OOS	-	-	-
29	JSM	-	-	-
30	LHS	-	-	-
	±	0	0	0
	+	0	0	0
	++	0	0	0
	+++	0	0	0
Mean score :			0.00	
판 정			무자극	

<그림> 임상 안정성 평가

VI. 고찰 및 결론

본 시험은 (주)지에프씨에서 의뢰한 “닥토바실러스/인삼발효여과물 함유크림”에 대한 피부 첩포 안정성 평가에 대한 인체적용시험이다.

(주)지에프씨의 “닥토바실러스/인삼발효여과물 함유크림”을 24시간 동안 피부에 첩포 하였으며, 첩포를 제거하고 30분, 24시간, 48시간이 경과된 후에 시험부위에서 나타난 피부 반응을 국제접촉피부염 연구회 (International Contact Dermatitis Research Group: ICDRG)의 관정기준에 따라 자극정도를 분류하고, 피부 첩포시험 (Patch Test) 결과 관정표에 따라 평균 피부반응도 (Mean score)를 구하였다.

피험자는 만 20세에서 65세의 성인 남녀 30명을 대상으로 시험을 수행하였으며 중도 탈락자는 없었다.

시험은 2017년 02월 20일부터 2017년 02월 28일 동안 진행되었으며, 피험자들은 총 4회 (시험 시각일, 패지제거일, 패지제거 후 24시간, 48시간) 방문하였다.

시험 결과, “닥토바실러스/인삼발효여과물 함유크림”은 패지 제거 후 30분, 24시간, 48시간 모두에서 자극이 관찰되지 않았다. 평균 피부반응도는 0.00으로 피부 첩포시험 (Patch Test)의 관정기준에 따라 “닥토바실러스/인삼발효여과물 함유크림”은 두자극으로 판정하였다.

<그림> 임상 안정성 평가

나. 피부 주름 개선 효능 테스트

준비 단계

시험 부위인 안면(눈가) 부위의 주름을 측정하기 위하여 피험자들의 측정 조건을 동일하게 하고자 시험 부위를 깨끗하고 마른 상태를 유지 하였으며 최소 30분간 항온항습($22\pm 2^{\circ}\text{C}$, R.H. 40~60%)이 유지되는 곳에서 피부 안정을 취한 후 진행하였다.

측정 단계

눈가 주름 측정

주름 측정은 PRIMOS(Phaseshift Rapid In-vivo Measurement Of Skin)를 이용하여 눈가 부위를 측정하였고, 시험 부위에 대한 정확한 재현성을 위해 기존 측정부위와 새로운 측정부위가 동일할 수 있도록 overlay 기능을 사용하여 측정하였다.

PRIMOS는 미세주름을 측정하기 위한 장비로 DMD(Digital Micromirror Device)에서 만들어진 미세한 줄무늬(fringe fraction)가 피부에 투영된다. 투영된 영상은 3차원 profile 정보로 나타나며 필터과정을 통해 PRIMOS프로그램(GFM, Germany)으로 분석된다.

PRIMOS 분석 변수로는 Ra와 R3z를 선정하였다.

- Ra(Arithmetic roughness average)

PRIMOS로 측정된 주름의 거칠기 단면 peak에 대한 산술 평균값으로 Ra값이 작아질수록 피부 주름의 깊이가 낮아져 주름이 개선됨을 의미하며, 단위는 μm 이다.

- R3z(Base roughness depth)

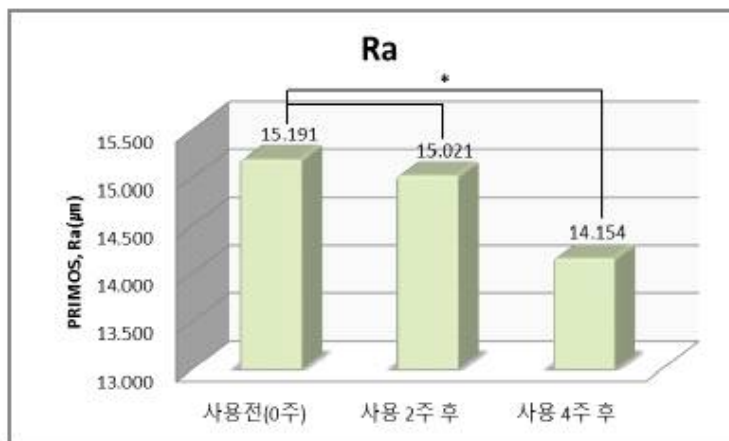
R3z는 R3z1부터 R3z5까지 5가지의 단일 거칠기 깊이에 대한 산술 평균으로 나타낸다. 단일 거칠기 깊이는 거칠기 단면의 단일 평가 거리(Ir)에서 세번째로 높은 단면 peak과 세번째로 깊은 곡선 사이의 수직거리를 의미한다. R3z의 값이 작아질수록 피부의 주름 깊이가 낮아짐을 의미하며 주름 개선이 되었음을 의미한다. 단위는 μm 이다.

Table 4. 통계학적 분석 결과

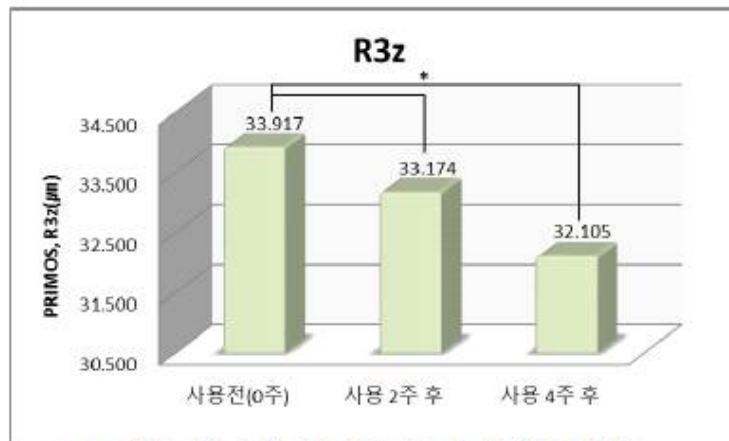
		Ra	R3z
p-value	사용 2주 후	0.448($p > 0.05$)	0.060($p > 0.05$)
	사용 4주 후	0.000($p < 0.05$)	0.008($p < 0.05$)

시험 제품 사용 후 눈가 주름 측정 결과를 정리하면 Fig. 3 과 같다.

Fig. 3 시험 제품 사용 후 눈가 주름 변화(단위: μm)



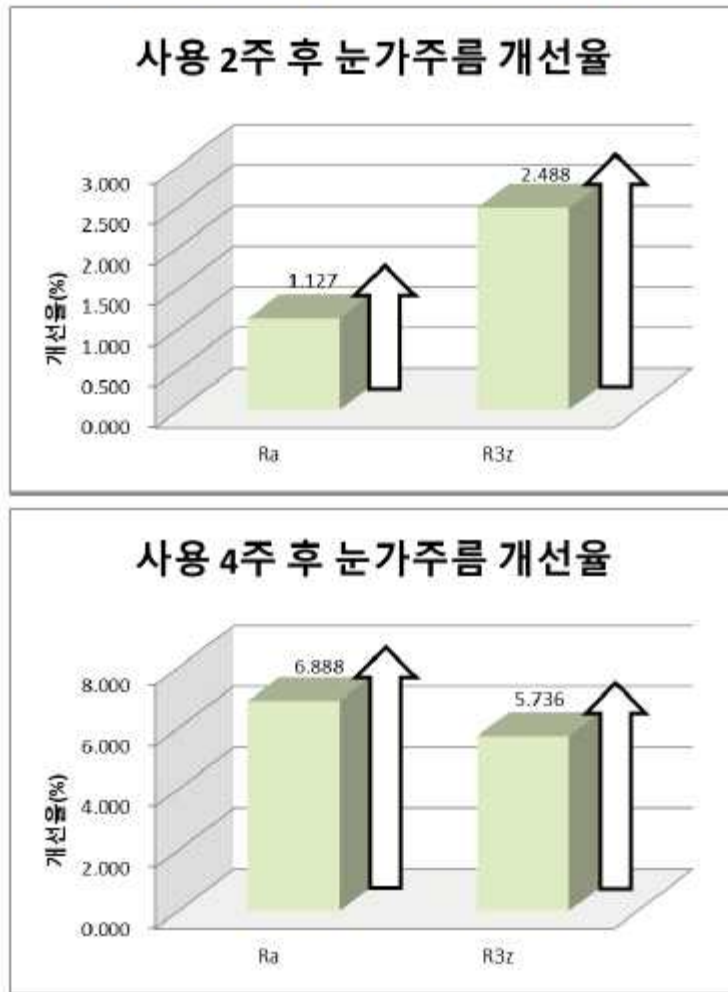
* $p < 0.05$ 제품 사용 전과 사용 후를 비교한 통계적 유의성



* $p < 0.05$ 제품 사용 전과 사용 후를 비교한 통계적 유의성

<그림> 임상 주름 개선

Fig. 4 시험 제품 사용 후 눈가 주름 개선율(단위: %)

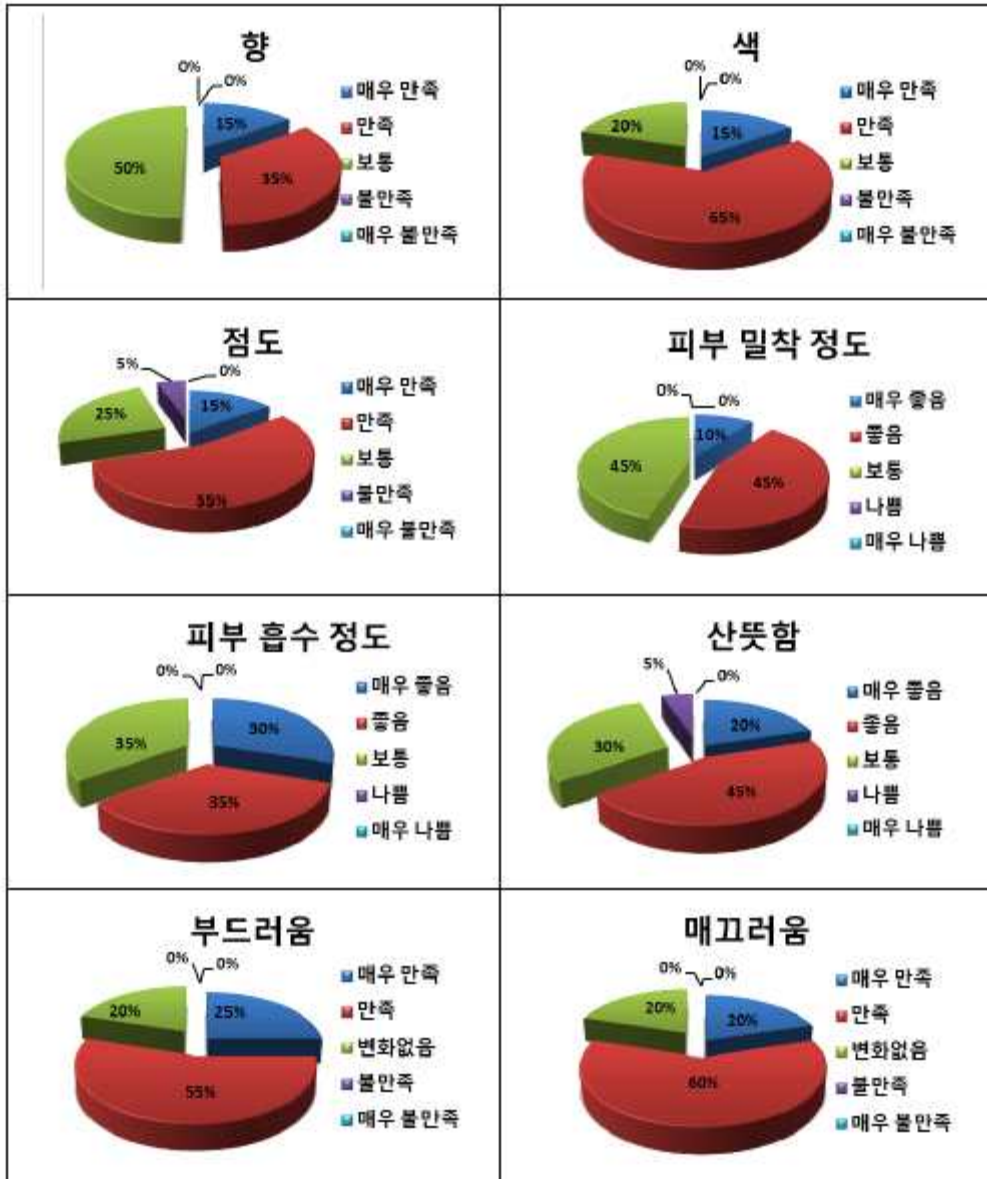


시험 제품은 제품 사용 전(0주)과 비교하여, 제품 사용 2주 후 Ra 1.127%, R3z 2.488%, 제품 사용 4주 후 Ra 6.888%, R3z 5.736%의 개선율을 확인하였다.

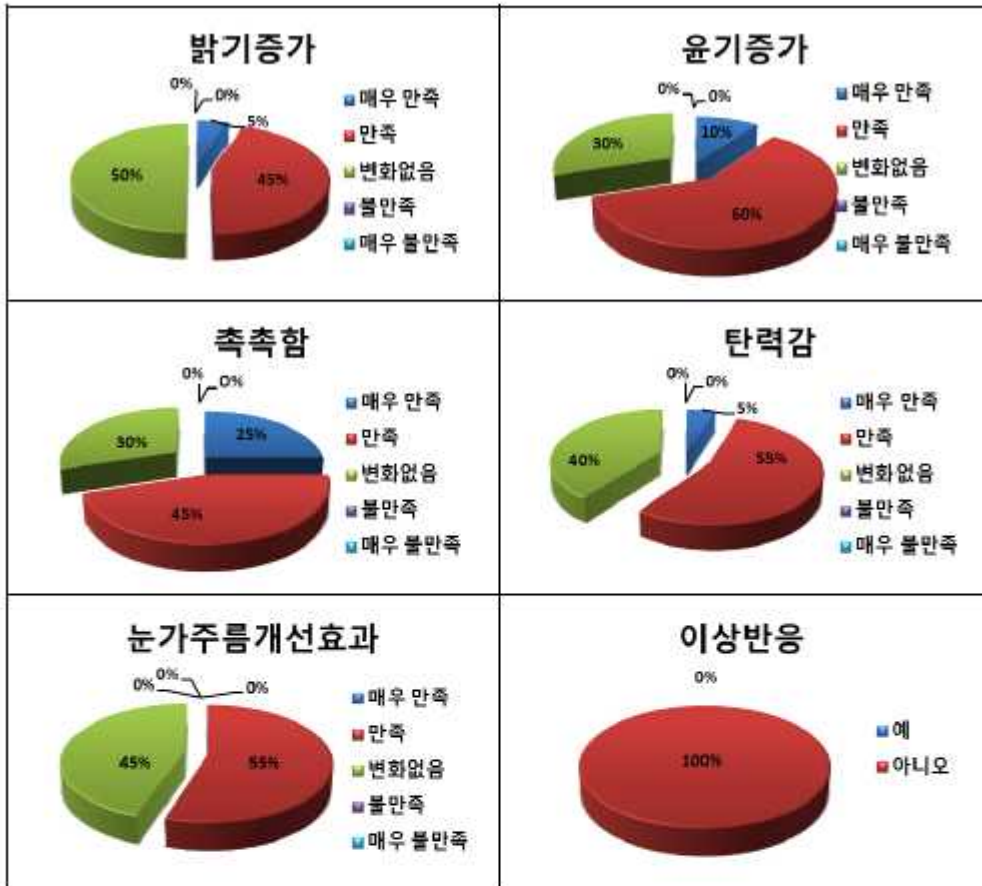
<그림> 임상 주름 개선

같다.

Fig. 6 효과에 대한 설문 결과



<그림> 임상 효능 설문 조사결과



<그림> 임상 효능 설문 조사결과

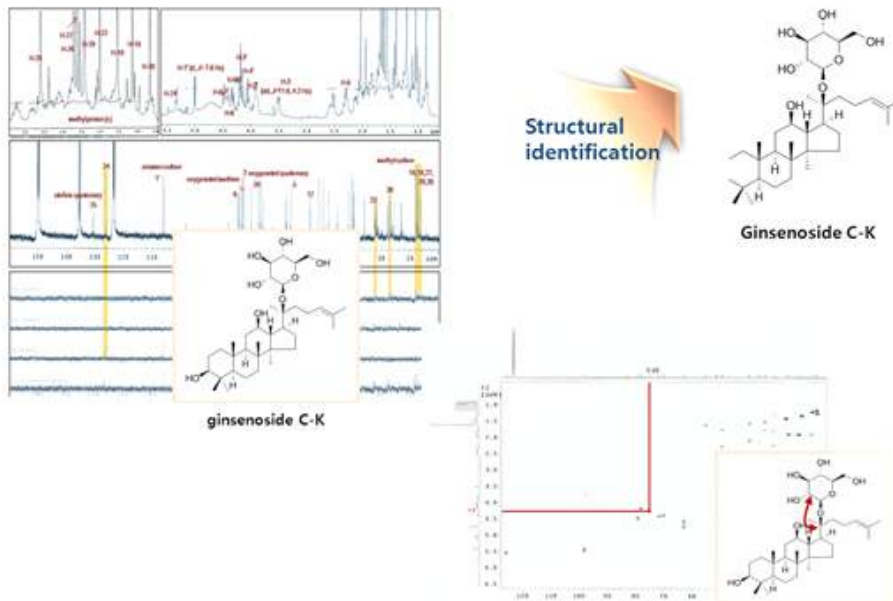
그 결과, 시험 제품 사용 전후에 따라 눈가 주름에 변화가 있음을 확인할 수 있었다. 변수 Ra는 제품 사용 전(0주) 15.191 μ m에서 제품 사용 2주 후 15.021 μ m, 제품 사용 4주 후 14.154 μ m로, R3z는 제품 사용 전(0주) 33.917 μ m에서 제품 사용 2주 후 33.174 μ m, 제품 사용 4주 후 32.105 μ m로 수치 변화를 확인 할 수 있었으며, 시험 제품의 사용 전(0주)과 비교하여 제품 사용 4주 후 Ra, R3z 모두에서 통계적으로 유의한 수준의 눈가 주름 개선 효과를 나타내었다(p<0.05). 또한 시험 제품 사용 전(0주)과 비교하여 제품 사용 2주 후 Ra 1.127%, R3z 2.488%, 제품 사용 4주 후 Ra 6.888%, R3z 5.736%의 눈가 주름 개선율을 나타내었다. 피부자극평가는 피험자에 의한 자가 평가 및 연구자의 육안평가를 토대로 실시하였으며, 그 결과 제품에 대한 이상반응은 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 “락토바실러스/인삼발효여과물 함유크림”은 눈가 주름 개선에 효과가 있는 것으로 사료된다(p<0.05).

5. 비교시 기준 시험법 확립

1) 인삼발효 추출물의 비교시 인증 관련 실험

① 지표물질 확립 시험 (NMR, IR)

분리한 화합물을 IR spectrum과 $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 을 400 MHz FT-NMR spectrometer (Varian Inova AS 400, USA)로 측정된 결과, ketone(1656 cm^{-1}), 수산기(3428 cm^{-1})의 존재를 확인하였다. 또한 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD , δc) 스펙트럼, 2D 기법인 gHMBC 실험을 종합하여 지표물질인 C-K를 발효물에서 동정하였다.



<C-K의 구조 동정>

③ 지표물질 확인 시험 (HPLC)

원료 내의 C-K 함량을 HPLC로 분석하였다. 지표물질 C-K을 약 0.05 g에 해당하는 양을 정밀하게 달아 이동상 용매 1 ml에 녹인 후, 1000배 희석한 액을 표준액으로 하였고, 원료는 6.9 ml에 해당하는 양을 정밀하게 달아 물에 희석하여 100 ml이 되게 한 액을 검액으로 하였다. 검액 및 표준액 10 μl 씩을 가지고 고성능액체크로마토그래프법을 시험하였고, CK의 피크면적 A_T (검액 면적) 및 A_S (표준액 면적)를 측정한다. 계산식은 아래와 같다.

$$C-K \text{의 양}(mg) = C-K \text{ 표준품의 양}(mg) \times \frac{1}{1000} \times \frac{A_T}{A_S}$$

원료의 3 Lot. No.(CA6023JW, CA6024JW, CA6025JW)를 각각 3회 측정된 결과는 아래의 그림과 같고 평균적으로 0.05008 mg 이상이 검출되는 것을 확인하였다.

Sample	면적(mV.sec)			
	1	2	3	평균
CA6023JW	652.633	646.129	651.382	650.048
CA6024JW	670.2269	658.362	650.129	659.573
CA6025JW	667.359	672.245	641.243	660.282

<원료내의 CK 면적값>

Sample	표준액에 의한 함량 (ppm)	회석배수를 고려한 농도	
		ppm	mg
CA6023JW	49.58	495.8	0.04958
CA6024JW	50.30	503.0	0.05030
CA6025JW	50.36	503.6	0.05036
평균		504.8	0.05008

<원료내의 CK 농도>

④ 정상 시험 (pH, 굴절률, 비중, 건조감량)

원료의 정상조사(pH, 굴절률, 비중, 건조감량)를 실시한 결과, 3 Lot. No.를 각각 3회 측정하였을 때 성상의 큰 변화가 없음을 확인하였다.

Lot No.	1회	2회	3회	평균
CA6023JW	5.42	5.54	5.52	5.52
CA6024JW	5.44	5.53	5.45	5.54
CA6025JW	5.41	5.52	5.42	5.52

<원료의 pH>

(단위 : n_D^{20})

Lot No.	1회	2회	3회	평균
CA6023JW	1.369	1.369	1.370	1.369
CA6024JW	1.369	1.369	1.370	1.369
CA6025JW	1.369	1.369	1.370	1.369

<원료의 굴절률>

(단위 : d_{20}^{20})

Lot No.	1회	2회	3회	평균
CA6023JW	1.013	1.014	1.013	1.013
CA6024JW	1.014	1.013	1.014	1.014
CA6025JW	1.011	1.012	1.014	1.012

<원료의 비중>

⑤ 총 호기성 생균수 시험

1) 시험장비

Bacto™ Tryptic soy Broth(BD 211825, USA), Petridish(SPL 10090, KOREA)incubator(JSGI-150T, (주)제이에스리서치, KOREA), Autoclave(JAC-100, JONGRO INDUSTRIAL CO., LTD, KOREA)

2) 시험방법

1) 검체의 전처리 : 수분산 검체의 경우 검체 1mL에 대두카제인소화배지(TSA broth) 9mL을 첨가하여 10배 희석액을 만들고 필요시 희석한다.

2) 총 호기성 세균수시험은 대두카제인소화한천배지를 사용하고 진균수 시험은 항생물질 *첨가 포테이토텍스트로즈 한천배지(pH 3.5)를 사용하였다.(1L당 40mg의 염산테트라사이클린을 멸균배지에 첨가하고 10% 주석산용액을 넣어 pH가 3.5±0.1이 되도록 조정)

3) 세균수 시험은 직경 9~10 cm 페트리 접시내에 미리 균힌 대두카제인소화배지 표면에 전처리 검액 1mL을 도말 한 후 30 °C에서 48시간 이상 배양하여 평판당 300개 이하의 균집락을 최대치로 하여 최대 균집락수를 갖는 평판을 사용하여 총 세균수를 측정한다.

4) 진균수 시험은 세균수 시험에 따라 시험을 실시하되 배지는 진균수 시험용 배지(항생물질첨가

포테이토 텍스트로즈 한천배지)를 사용하여 20~25°C에서 적어도 5일간 배양한 후 100개 이하의 균집락이 나타나는 평판을 세어 총 진균수를 측정한다.

5) 상기 실험은 식품의약품안전처 고시 제2015-110호 '화장품 안전기준 등에 관한 규정'의 총 호기성 생균수 시험법에 따라 실시되었다.

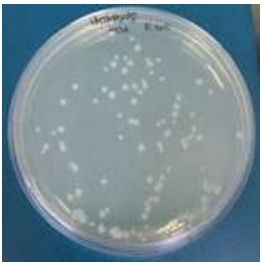
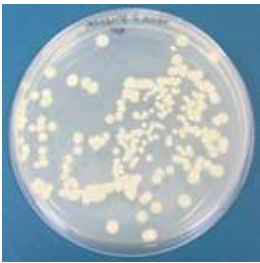
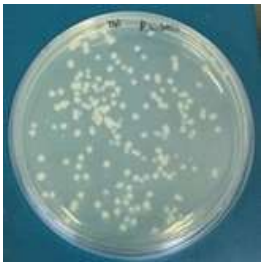

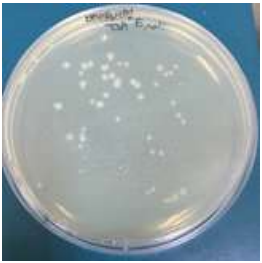

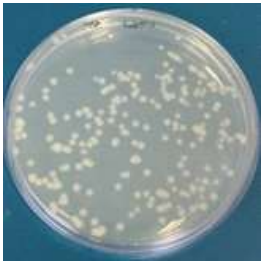

[계산식] 총 호기성 생균수 = 세균수 + 진균수

(x: 평판에서 검출된 집락 수, n: 평판의 개수, d: 검액의 희석배수)

$$\text{세균(진균) 수} = \frac{(x_1+x_2+x_3)}{n} \times d$$

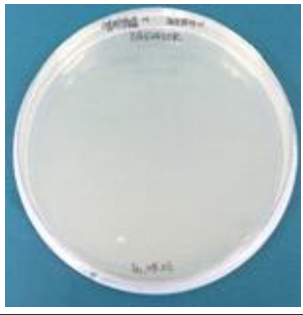
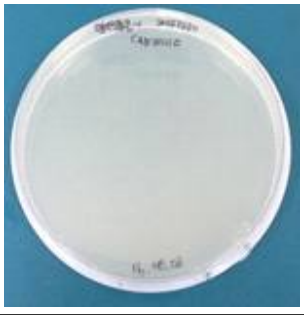
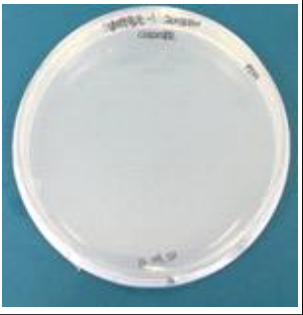
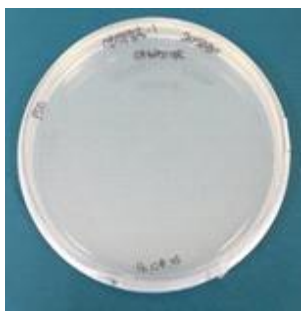
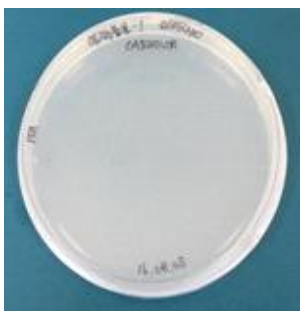
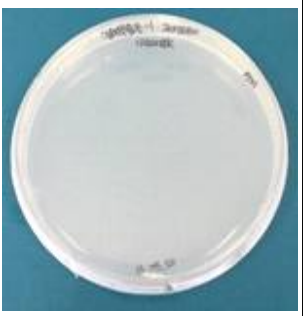
Product	Result	
CA6023JW	호기성 세균 수	불검출
	호기성 진균 수	불검출
CA6024JW	호기성 세균 수	불검출
	호기성 진균 수	불검출
CA6025JW	호기성 세균 수	불검출
	호기성 진균 수	불검출

배지 성능시험 결과 사진

시험균주	세균시험배지 - TSA			진균시험배지 - PDA
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
1반복				
2반복				
CFU/mL	8.5×10^2	1.3×10^3	1.32×10^3	9.2×10^2

∴ 해당시험균 접종 (3.0×10^2 이상) 및 배양 결과, 배지성능에 이상 없음 확인

총 호기성 생균수 측정 결과 사진

CA6023JW			
3반복	1회	2회	3회
호기성 세균수			
테스트결과	불검출	불검출	불검출
호기성 진균수			
테스트결과	불검출	불검출	불검출

<원료의 총 호기성 세균수 측정 결과>

⑥ 중금속 시험

1) 납 시험

본 품 0.15 g을 정밀하게 달아 석영 또는 테트라플루오로메탄제의 극초단파 분해용 용기의 기벽에 닿지 않도록 조심하여 넣고, 질산 7 mL, 염산 2 mL, 황산 1 mL를 넣고 뚜껑을 닫은 다음 용기를 극초단파분해 장치에 장착하고 아래의 조작조건에 따라 무색~엷은 황색이 될 때까지 분해한다. 상온으로 식힌 다음 뚜껑을 열고 분해물을 50 mL 용량 플라스크에 옮기고 초순수로 용기 및 뚜껑을 씻어 넣고 초순수를 넣어 전체량을 50 mL로 하여 검액으로 한다. 단, 침전물이 있을 경우 여과하여 사용한다. 따로 납(Pb) 표준원액(100 ug/mL) 1 mL를 정확하게 취하여 희석시킨 질산(0.5→100)을 넣어 10 mL한 액을 1차 표준액(10 ug/mL)으로 한다. 이 1차 표준액(10 ug/mL)을 각각 0.1 mL, 0.5 mL, 1.0 mL, 5.0 mL 및 10.0mL를 정확하여 각각 취하여 100mL 용량플라스크에 각각 넣은 후, 희석시킨 질산(0.5→100)을 넣어 100 mL로 한 용액을 검량선용 표준액으로 한다. 이 표준액의 농도는 각각 1 mL 당 납 0.01 ug, 0.05 ug, 0.1 ug, 0.5 ug, 1.0 ug을 함유한다. 검체를 제외하고 검액과 동일하게 전처리한 용액을 공시험액으로 하고, 표준액 및 검액을 가지고 다음의 조작조건으로 유도결합플라즈마분광기(ICP-OES)에 납의 검정곡선으로 부터 검액 중의 납의 농도를 산출하여 함량을 구한다. 단, LOQ 이하의 검출 값은 불검출로 판정

한다. 사용장비의 조작조건과 계산식은 아래와 같다.

사용장비 : Microwave

(최대출력 1000W, 최고온도 200℃, 분해시간 35분, 주입량 1.5ml/min)

ICP-OES

(파장 220.353 nm, 플라즈마기체 아르곤)

$$\text{계산식 : 납 함량}(\mu\text{g/g}) = \frac{\text{측정농도}(\text{mg/L}) \times \text{최종부피}(L) \times \text{순도}}{\text{시료 채취량}(g)}$$

2) 비소 시험

본 품 0.15 g을 정밀하게 달아 석영 또는 테트라플루오로메탄제의 극초단파 분해용 용기의 기벽에 닿지 않도록 조심하여 넣고, 질산 7 mL, 염산 2 mL, 황산 1 mL를 넣고 뚜껑을 닫은 다음 용기를 극초단파분해 장치에 장착하고 아래의 조작조건에 따라 무색~옅은 황색이 될 때까지 분해한다. 상온으로 식힌 다음 뚜껑을 열고 분해물을 50 mL 용량 플라스크에 옮기고 초순수로 용기 및 뚜껑을 씻어 넣고 초순수를 넣어 전체량을 50 mL로 하여 검액으로 한다. 단, 침전물이 있을 경우 여과하여 사용한다. 따로 비소(As) 표준원액(100 ug/mL) 1 mL를 정확하게 취하여 희석시킨 질산(0.5→100)을 넣어 10 mL한 액을 1차 표준액(10 ug/mL)으로 한다. 이 1차 표준액(10 ug/mL) 각각 0.1 mL, 0.5 mL, 1.0 mL, 5.0 mL 및 10.0mL를 정확하여 각각 취하여 100mL 용량플라스크에 각각 넣은 후, 희석시킨 질산(0.5→100)을 넣어 100 mL로 한 용액을 검량선용 표준액으로 한다. 이 표준액의 농도는 각각 1 mL 당 비소 0.01 ug, 0.05 ug, 0.1 ug, 0.5 ug, 1.0 ug를 함유한다. 검체를 제외하고 검액과 동일하게 전처리한 용액을 공시험액으로 하고, 표준액 및 검액을 가지고 다음의 조작조건으로 유도결합플라즈마분광기(ICP-OES)에 비소의 검정곡선으로부터 검액 중의 비소의 농도를 산출하여 함량을 구한다. 단, LOQ 이하의 검출 값은 불검출로 판정한다. 사용장비의 조작조건과 계산식은 아래와 같다.

사용장비 : Microwave

(최대출력 1000W, 최고온도 200℃, 분해시간 35분, 주입량 1.5ml/min)

ICP-OES

(파장 220.353 nm, 플라즈마기체 아르곤)

$$\text{계산식 : 비소 함량}(\mu\text{g/g}) = \frac{\text{측정농도}(\text{mg/L}) \times \text{최종부피}(L) \times \text{순도}}{\text{시료 채취량}(g)}$$

3) 수은 시험

본 품 0.03 g을 정밀하게 달아 수은분석기용 ceramic boat의 가운데 위치에 조심하여 넣는다. 따로 수은(Hg) 표준원액(1,000 ug/ml) 0.1 ml을 정확하게 취하여 희석시킨 L-Cystein(0.5→100)을 넣어 10 ml한 액을 1차 표준액(10 ug/ml)으로 한다. 이 1차 표준액(10 ug/ml)을 다시 0.1 ml을 정확하여 취하여 희석시킨 L-Cystein(0.5→100)용액을 넣어 10 ml한 액을 2차 표준액(0.1 ug/ml)으로 한다. 이 2차 표준액(0.1 ug/ml)을 각 1.0 μl, 10 μl, 100 μl를 정확하여 각각 취하여 검량선용 ceramic boat에 넣은 후 검체를 제외한 수은분석기용 ceramic boat를 공시험액으로 하고, 표준액 및 검체를 가지고 다음의 조작

조건으로 수은분석기에 수은의 검정곡선으로부터 검체 중의 수은의 양을 산출한 후 함량을 구한다. 단, LOQ 이하의 검출 값을 불검출로 판정한다. 사용장비의 조작조건과 계산식은 아래와 같다.

사용장비 : 수은측정장치

계산식 : 수은함량($\mu\text{g/g}$) = 측정농도($\mu\text{g/g}$) \times 순도

Lot No.	1회	2회	3회	평균
CA6023JW	< 20 $\mu\text{g/ml}$	< 20 $\mu\text{g/ml}$	< 20 $\mu\text{g/ml}$	불검출 (<20 $\mu\text{g/ml}$)
CA6024JW	< 20 $\mu\text{g/ml}$	< 20 $\mu\text{g/ml}$	< 20 $\mu\text{g/ml}$	불검출 (<20 $\mu\text{g/ml}$)
CA6025JW	< 20 $\mu\text{g/ml}$	< 20 $\mu\text{g/ml}$	< 20 $\mu\text{g/ml}$	불검출 (<20 $\mu\text{g/ml}$)

<원료의 납 시험 결과>

Lot No.	1회	2회	3회	평균
CA6023JW	< 10 $\mu\text{g/ml}$	< 10 $\mu\text{g/ml}$	< 10 $\mu\text{g/ml}$	불검출 (<10 $\mu\text{g/ml}$)
CA6024JW	< 10 $\mu\text{g/ml}$	< 10 $\mu\text{g/ml}$	< 10 $\mu\text{g/ml}$	불검출 (<10 $\mu\text{g/ml}$)
CA6025JW	< 10 $\mu\text{g/ml}$	< 10 $\mu\text{g/ml}$	< 10 $\mu\text{g/ml}$	불검출 (<10 $\mu\text{g/ml}$)

<원료의 비소 시험 결과>

Lot No.	1회	2회	3회	평균
CA6023JW	< 1 $\mu\text{g/ml}$	< 1 $\mu\text{g/ml}$	< 1 $\mu\text{g/ml}$	불검출 (<1 $\mu\text{g/ml}$)
CA6024JW	< 1 $\mu\text{g/ml}$	< 1 $\mu\text{g/ml}$	< 1 $\mu\text{g/ml}$	불검출 (<1 $\mu\text{g/ml}$)
CA6025JW	< 1 $\mu\text{g/ml}$	< 1 $\mu\text{g/ml}$	< 1 $\mu\text{g/ml}$	불검출 (<1 $\mu\text{g/ml}$)

<원료의 수은 시험 결과>

⑦ 잔류 MeOH 시험

1) 시험장비

GC-FID (영린기기 ACME6100), Methyl alcohol(99.9%, 대정화금)

2) 시험방법

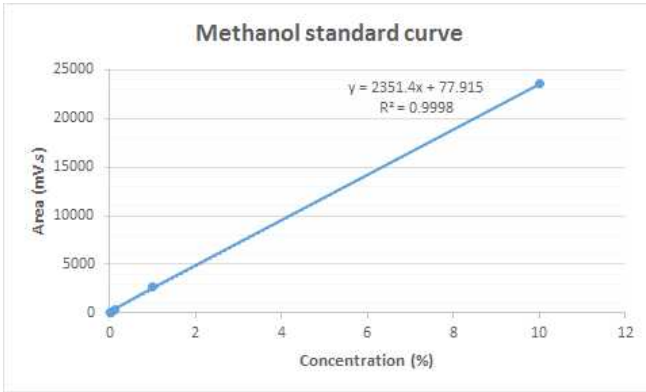
- 1) MeOH을 표준액으로 하여 검량선을 그린다.
- 2) 표준액 1 μ l를 주입하여 GC-FID에서 측정한다.
- 3) 검량선을 그려 R²(0.9 이상)이 1에 가까운 가를 확인한다. (1 \geq R² > 0.9)
- 4) 검체의 1.0 g을 정밀하게 취하여 DW를 넣어 10ml로 한다.
- 5) 검액 1 μ l를 주입하여 GC-FID에서 측정한다.
- 6) 검량선 수식에 대입하여 MeOH을 정량한다.
- 7) 상기 실험은 ‘화장품 안전기준 등에 관한 규정 (제2015-43호)’의 시험법에 따라 실시되었다.

<분석 조건>

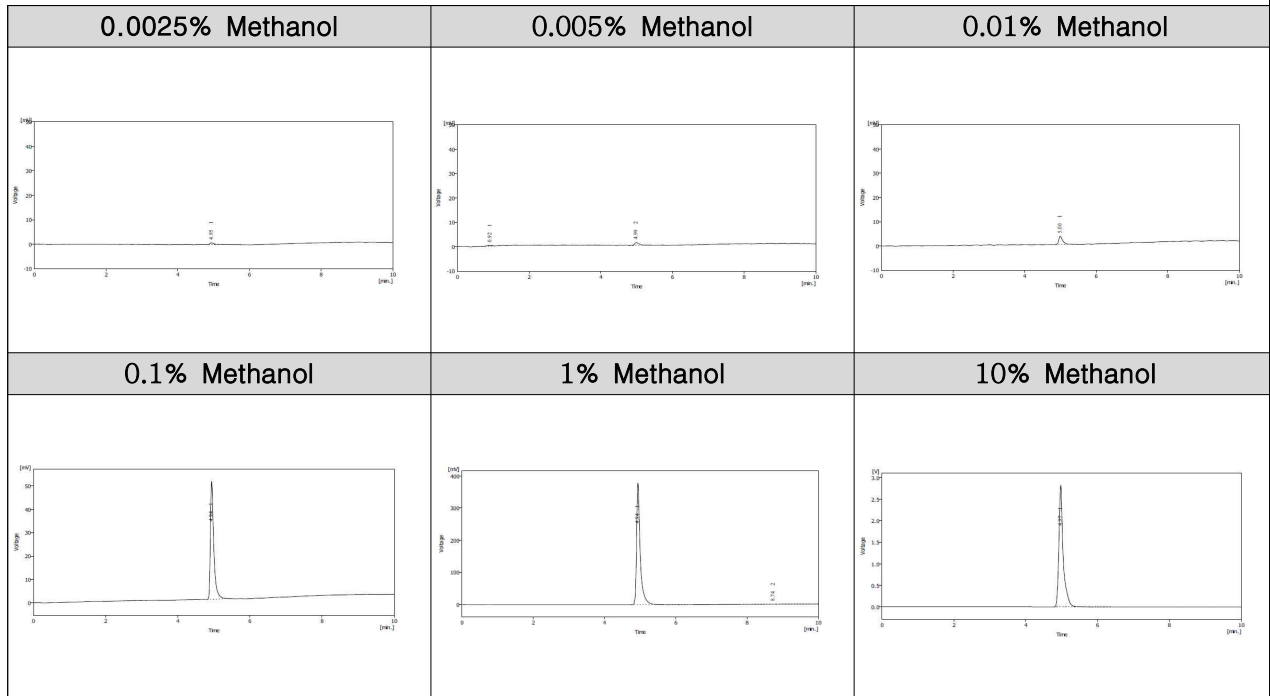
구 분	조 건	구 분	조 건
Column	DB-WAX (30m*0.32mm*0.5 μ m)	Gas flow	질소 1.0 mL/min
오븐 온도	50 $^{\circ}$ C(5min) - 10 $^{\circ}$ C 상승/min - 150 $^{\circ}$ C(2min)	주입구 온도	200 $^{\circ}$ C
주입 모드	Split (20:1)	검출기 온도(FID)	240 $^{\circ}$ C

[계산식] $y = 2351.4x + 77.915$ (y: mV*sec, x: concentrations)

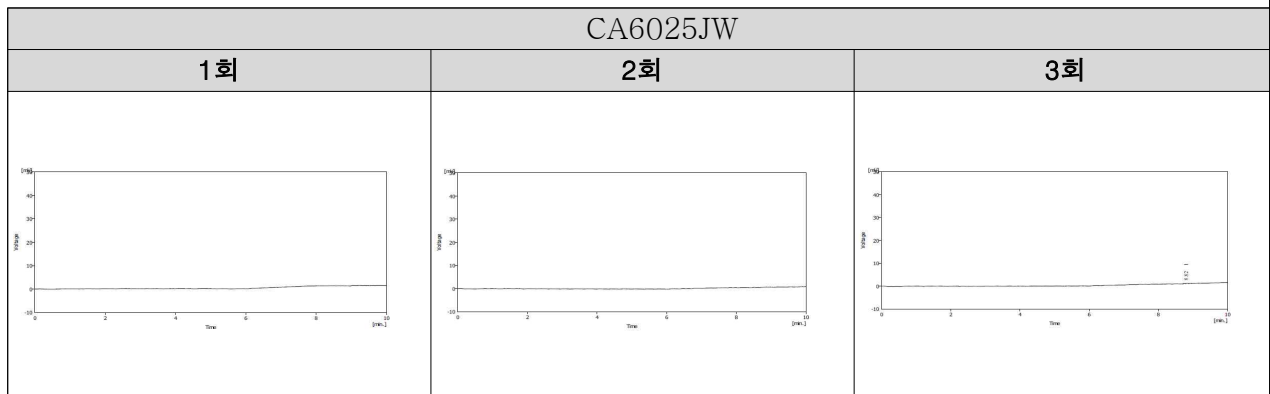
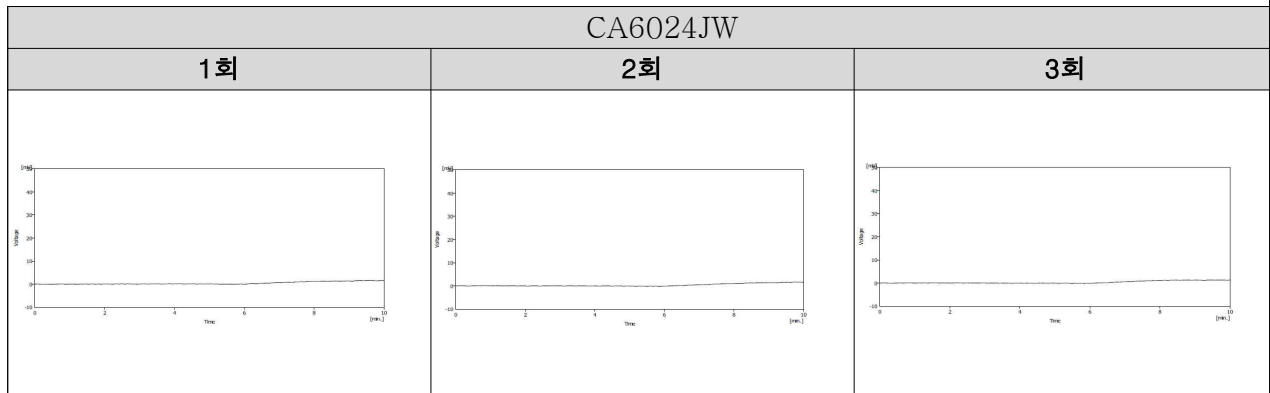
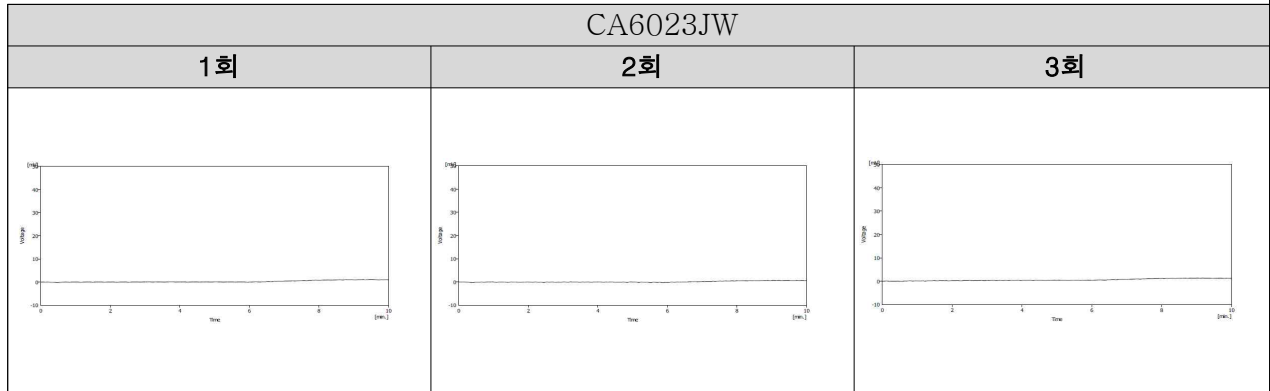
<MeOH 표준품>



Concentrations (%)	면적 (mV*sec)
0.0025	5.535
0.005	10.501
0.01	25.179
0.1	325.140
1	2675.478
10	23566.994



<원료에서의 잔류 용매 검사>



∴ 3 Lot 3회 반복실험을 통해 홍삼 발효 추출물서 MeOH이 검출되지 않음을 확인하였다.

⑧ 원료의 안정성 시험

제조된 추출물은 정상조사(pH, 취, 색상, 굴절률, 비중)를 실시하였고 제조직후와 3개월 경과 후의 안정도를 확인한 결과, 3개월 경과 후에도 큰 정상차이가 없는 것으로 나타났다.

인삼발효추출물		제조직후	3개월 경과 후
	pH	5.5	5.5
	취	특이취	특이취
	색상	황색의 투명한 액상	황색의 투명한 액상
	굴절률	1.370	1.371
	비중	1.012	1.012

<안정화 확인 결과>

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
연차별 목표 달성도			
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)
1차 년도 (2014)	한국형 토종 미생물을 통한 유효성분의 생산 기술 개발	기 개발 균주의 최적 배양 조건의 확립 및 한국형 신규 미생물의 분리 및 동정	100
		미생물 특성 검정 연구	100
			연구개발 수행내용
			<ul style="list-style-type: none"> - 균주 최적 성장 조건의 확립 - 전환이 가장 좋은 배지에 접종한 후 25, 30, 35, 40 °C 등 다양한 온도에서 배양하여 최적 온도 조건 탐색 - 최적 전환 배지와 온도 조건에서 다양한 pH 별로 배양하여 최적 pH 조건을 탐색 - 한국형 신규 미생물의 추가 7건 분리 동정 완료
			<ul style="list-style-type: none"> - 미생물의 in vitro 독성 검정 - 미생물 인삼 사포닌 발효 전환 능력 검정 - 균배양액을 centrifugation하여 침전물을 액화질소 또는 sonication 하여 cell 파쇄 유도 세포질 성분 획득 (Lysate) - Ginsenoside와 반응시켜 전환을

			보이는 성분 확인 및 -glucosidase activity 확인
한국형 미생물을 이용한 발효 홍삼제품개발	농산물과 혼합배양을 통한 발효 연구	100	- 인, 홍삼 발효 조건의 확립 - 균주 최적 발효 조건의 탐색 - 산삼배양근 발효 공정 test - 발효를 통한 이화학적 성분 변 화 확인 - HPLC를 활용한 profiling 분석 - 산업화 적용을 위한 scale up 연구 - 표준화를 위한 효능 표준 물질 선정 사전 연구
한국형 미생물의 기능성 검정 및 제품화 기 술 개발	미생물의 효능 screening 분석	100	- 미생물 자체의 면역 기능성 검 정을 위한 in vitro test - 미생물 발효물을 활용한 비만세 포를 활용한 항비만 in vitro test - 세포독성 확인을 통한 안정성 test
한국형 미생물을 활용한 인삼/ 산삼배양근 발 효 음료 개발	산삼배양근 발효 시제품생산 - 사포닌 함량 증대 인삼/ 산삼배양근 배양기술 표준 화	100	-산삼배양근 ginsenoside HPLC 분석 -산삼배양근 발효물 HPLC 분석 -기능성 성분의 제조 공정 검토
		100	- 사포닌 증대 조직배양 최적화 - 최적 Growth curve에 따른 생 산 표준화
한국형 미생물을 이용한 발효 식물추출물개 발	미생물 활용 인삼 발효 제품 시생산	100	-기능성 성분(원료)의 규격 기준 의 설정 -기능성 성분의 제조공정 검토 및 표준화를 통한 시제품 생산 1건 -기능성 성분의 함량 및 품질의 표준화
한국형 미생물을 활용한 기능성 화장품 원료 및 제품개발	미생물 Prebiotic 산물을 활용한 기능성 화장품 소재 검정	100	- 미생물 Prebiotic의 in vitro 독 성 검정 - 한국형 미생물 배양물 및 Lysate의 피부 효능 활성 검정 - 인삼 발효물의 효능검정 - tyrosinase의 억제 활성 검정을 통한 미백 기능성 검정 - 주름 관련 in vitro 활성 검정

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2015)	한국형 토종 미생물을 통한 유효성분의 생산 기술 개발 (1세부)	상업적 생산을 위한 균주의 대량배양 및 발효능력 검증	100	-1차년도 개발 균주를 활용한 최적 균주 발효 조건 탐색 - 협동 및 세부기관과 협력하여 개 발균주의 각 소재군별 개발 방향 확립 (균주별 식품, 화장품 소재 로 구분)
		산업화 연구를 통한 균주의 활용 방안 확립	100	- 균주의 대량 배양방법 확립 (3협동 과제 연계 연구)
		기능성 미생물 발효제품 개발 프로세스 확립	100	-미생물 발효 성분의 기능성 확인 을 위한 분리 분석 - LC/MS, NMR을 이용한 구조 분 석 -기능성 성분 선별을 통한 표준 효 능 물질 후보 물질 선정
		효능 표준 후보 물질선발 및 기능성 검증	100	-미생물 자체 생산 물질에 대한 효능 표준 물질의 선발 -인삼 및 산삼배양근에 대한 발효물의 효능 표준 후보물질의 선발(1협동과제 연계연구) -물질의 분리 및 분리 물질의 in vitro 기능성 검증
	한국형 미생물의 기능성 검증 및 제품화 기술 개발 (2세부)	미생물 발효 산물의 기능성 screening	100	- In silico docking을 활용한 효능 예측 - in vitro 세포 독성 검증 -HP20 column chromatography를 이용한 인삼 조사포닌 분획의 제 조 -silica gel 및 ODS column chromatography를 이용한 발효 단일 물질의 분리 - 시장 수요 기능성 확정 및 기능 성 물질 개발
		기능성분의 표준화를 위한 조건 탐색	100	- 기능성분의 함량별 활성 확인 - 사업화를 위한 기능성분의 함량 가이드라인 설정 - 기존 사포닌 대비 신규 사포닌의 효능 특이성 검증
	한국형 미생물을 활용한 인삼/산삼 배양근 발효 음료	특수사포닌 전환 균주 및 발 효 최적화	100	유산균+국균에 의한 복합발효를 통한 발효 및 진세노사이드 전환 최적화
진세노사이드 전환 프로세스		100	유산균+국균에 의한 복합발효를	

개발	최적화		통한 발효 및 진세노사이드 전환 최적화	
	진세노사이드 전환율에 따른 발효 공정 표준화	100	Scale-up을 통한 발효공정 및 생산 표준화 --> Flask test --> 5L Jar Fermentation --> 30L Fermentation --> 500L fermentation	
	기능성 관련 추출/분리/정제/기기 분석 관련 프로세스 구축	100	진세노사이드 및 지표물질에 대한 추출 조건 확립 기기분석 중 HPLC, LC-MS/MS 분석 표준화	
한국형 미생물을 이용한 발효 홍삼제품개발 (2협동)	발효 홍삼 발효를 통한 기능성 제품의 개발 및 생산	100	-발효미생물 대량배양 및 발효 안정화 공정 -음료 개발 및 표준화 공정 설정 -소비자 니즈 및 동향 분석을 위한 캐리어 관련 소비자 기호도/선호도 조사 -관능 평가에 따른 레시피 및 제품 최적화 -자사 또는 전문 OEM을 통한 최종제품 규격 최적화	
한국형 미생물을 이용한 발효 식물추출물개발 (3협동)	1세부 개발 신규 미생물의 대량 생산 및 pilot 스케일 제조	100	- 1세부에서 공급받은 균를 활용한 600L 및 1톤 발효조를 활용한 균주의 대량 생산 방법 및 공정 구축 -기존 배지 및 천연배지를 활용한 균주 생장 분석	
	식물 발효 추출물 개발 및 시제품 제작	100	- 돌외, 황칠을 이용한 발효 소재의 개발 - 발효 식물 추출 시제품 제작	
한국형 미생물을 활용한 기능성 화장품 원료 및 제품개발(4협동)	인삼 발효물을 이용한 피부 기능성 검정 및 원료화	100	- in vitro 세포 독성 검정 - in silico docking을 이용한 피부 활성 예측 - 인삼 발효물 피부 기능성 표준물질 선정을 위한 미백 및 항주름 효과의 in vitro test - 임상 시험을 위한 물질의 기능물질 확보 및 임상시험용 시제품 제작	
구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도	연구개발 수행내용

				(%)
3차 년도 (2016)	한국형 토종 미생물을 통한 유효성분의 생산 기술 개발 (1세부)	선발된 기능성 소재의 활성평가	100	-1차년도 개발 균주를 활용한 최적 균주 발효 조건 탐색 - 협동 및 세부기관과 협력하여 개 발균주의 각 소재군별 개발 방향 확립 (균주별 식품, 화장품 소재 로 구분)
		산업화 연구를 통한 균주의 활용 방안 확립	100	- 균주의 대량 배양방법 확립 (3협동 과제 연계 연구)
		사업화 공정 개선을 통한 사포닌 함량 증대	100	-미생물 발효 성분의 기능성 확인 을 위한 분리 분석 - LC/MS, NMR을 이용한 구조 분 석 -기능성 성분 선별을 통한 표준 효 능 물질 후보 물질 선정
		기능성 미생물 발효제품 개발 프로세스 확립	100	-미생물 자체 생산 물질에 대한 효능 표준 물질의 선발 -인삼 및 산삼배양근에 대한 발효물의 효능 표준 후보물질의 선발(1협동과제 연계연구) -물질의 분리 및 분리 물질의 in vitro 기능성 검정
	한국형 미생물의 기능성 검정 및 제품화 기술 개발 (2세부)	효능 표준 후보 물질선발 및 기능성 검정	100	-미생물 자체 생산 물질에 대한 효능 표준 물질의 선발 -인삼 및 산삼배양근에 대한 발효물의 효능 표준 후보물질의 선발(1협동과제 연계연구-2차년도 연계 지속연구) -물질의 분리 및 분리 물질의 in vitro 기능성 검정
		미생물 발효 산물의 기능성 screening	100	- 세부 과제 및 협동과제 개발 물의 in vitro 효능활성 검정 - 신규 사포닌의 in vitro 지속 적인 기능성 검정 : 항염 및 면역기능성 연구 : 간독성평가 - 기능성분의 분리 및 동정을 통한 제품 표준화 지표 수립
	기능성분의 표준화를 위한	100	- 성분별 효능 검정 및 성분 농	

		조건 탐색		도에 따른 효능 확인을 통한 제품 가이드 함량 제시
한국형 미생물을 활용한 인삼/산삼 배양근 발효 음료 개발		기능성 관련 추출, 분리, 정제 기기 분석, <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 프로세스 구축	100	항산화 기능성 검정
		항산화/피로회복 기능성 시장 동향 및 현황 조사	100	항산화/피로회복 시장 조사
		소비자 니즈 및 동향 분석을 위한 캐리어 관련 소비자 기호도/선호도 조사	100	- 소비자 동향 분석 자료를 바탕으로 한 최적 레시피 구축
		관능 평가에 따른 레시피 및 제품 최적화 및 자사 또는 전문 OEM을 통한 최종 Prototype 및 시제품 생산 및 규격 최적 화	100	최종 prototype 제작 - 사업화 제품 1건
한국형 미생물을 이용한 발효 홍삼제품개발 (2협동)		발효 홍삼 발효를 통한 기능성 제품의 개발 및 생산	100	-개발 인삼음료 시제품 제조 및 소비자 기호성 평가 -품질 개선 발효홍삼음료 시제품 제조 및 소비자 만족도 평가를 통한 인삼음료 최적 모델 설정 -발효 인삼음료 최적 모델의 산업적 음료라인 적용, 시생 산 및 품질관리규격 설정 -현장 시생산 및 본생산을 통한 생산 공정 최적화 -개발소재 원료를 이용한 다양 한 컨셉의 제품 type 개발 -Brand naming 및 마케팅 전 략수립 -초기 런칭을 위한 홍보 체계 구축 (on-off line 매체 활용) - 사업화 제품 1건 출시
한국형 미생물을	사업화 process 개발	100	- 1,2차년도 연구과제 성과물을 바	

				탕으로 산업화 공정 개발 - pilot test를 통한 산업화 스케일에서의 문제점 및 개선 방향 분석
	이용한 발효 식물추출물개발 (3협동)	농산물 발효를 통한 고기능성 제품 생산	100	-원료 및 완제품 생산 공정 프로세스 개발 -대량생산 표준 시스템 기술 개발 -시제품 생산 및 제조표준 완성 -발효ginsenoside 함량을 활용한 제품의 표준화 -발효원료를 이용한 3종의 제품 출시(사업화)
	한국형 미생물을 활용한 기능성 화장품 원료 및 제품개발(4협동)	전임상 및 임상 연구를 통한 주름 및 미백 활성 기능성 화장품 소재 개발	100	- in vitro 세포 독성 검정 - in vitro 미백 활성 소재의 임상 연구 - 임상을 통한 기능성 검증 - 주름 및 미백 기능성 소재의 CTFA 등록 - 미백 효과(기능성) 화장품 원료 제품 출시

4-2. 관련분야 기여도

연구개발 내용	국내,외 기술개발현황	현 위치	기여도
한국형 미생물의 발굴	국내소재 미흡	中	100%
신규 유산균을 활용한 인삼 사포닌 전환 기술 개발	표준화 미흡	中	100%
개발 미생물과 국내 농산물과의 발효를 통한 고기능성 물질의 발굴	표준화 미흡	中	100%
인삼 발효물 피부 기능성 검정	비교시기능성연구 미흡	中	100%
신규 인삼 사포닌 생성 기술	신규 사포닌 소재 미흡	中	100%
최적 Growth curve에 따른 조직배양생산 표준화	PPT계열 증폭 미흡	中	100%
특수사포닌 전환 균주 및 발효 최적화	Scale-up 표준화 미흡	中	100%
진세노사이드 전환 프로세스 최적화 및 전환율에 따른 발효 공정 표준화	Scale-up 표준화 미흡	中	100%
기능성 관련 추출/분리/정제/기기 분석 관련 프로세스 구축	진세노사이드 분석표준화 미흡	中	100%

5. 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
------	------

제1절 연차별 연구개발 성과

1) 성과지표 및 달성도 (정량 및 정성적 목표)

(1) 연구성과 목표

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타 연구 활용 (타 연구 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창업	고용창업	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
			SCI						비SCI								
최종목표	6	3	3	5					15	5		10			10	5	
1차년도	목표	1	0	0	0				2	1		0	0		0		
	실적	1	0	0	0				3	0		0	0		0		
2차년도	목표	2	1	0	0				6	2		0	0		0		
	실적	5	1	0	2				6	0		0	4		0		
3차년도	목표	3	2		5				7	2							
	실적	3	2		5				10	1							
소계	목표	6	3	3	5				15	5		10	0		10		
	실적	9	3	2	7				19	1		10	4		20		

<특허>

지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격], **신품종**, 프로그램개발 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로)기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다]

구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기타
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
특허출원	신규한 식물 생장 촉진 미생물 및 이의 용도진세노사이드	대한민국	경희대학교 산학협력단	2015.03.20	10-2015-0038984				

특허출원	케톤화된 진세노사이드의 제조방법 및 이의 이용	대한민국	경희대학교 산학협력단	2015.04.28	10-2015-0060044				
특허출원	진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 체 및 이의 용도	대한민국	경희대학교 산학협력단	2015.03.17	10-2015-0036992				
특허출원 / 등록	산삼 배양근 88 및 이의 판별을 위한 마커	대한민국	한방바이오 주식회사	2014.11.28	10-2014-0168913	한방바이오 주식회사	2015.08.28	1015500070000	
특허출원	진세노사이드 유도체의 제조방법 및 이에 의해 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 조성물	대한민국	경희대학교 산학협력단	2014	10-2014-0002872				
특허출원	PPT 계열의 진세노사이드 함량을 증가시키는 인삼 조직배양방법	대한민국	샘표식품주식회사	15.09.14	10-2015-0129784				
특허출원 / 등록	락토바실러스 배양용 배지 조성물, 이를 포함하는 인삼 열매 발효 추출물 및 피부상태 개선용 화장료 조성물	대한민국	지에프씨	2014.11.28	10-2014-0168072	지에프씨	2016.12.07	10-1686112	

<논문>

논문(국내외 전문학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	Enzymatic transformation of ginseng leaf saponin by recombinant β -glucosidase (bgp1) and its efficacy in an adipocyte cell line	Biootechnology and Applied Biochemistry	Md. Amdadul Huq	63:532	국외		SCI
2	Ginsenoside F2 possesses anti-obesity activity via binding with PPAR γ and inhibiting adipocyte differentiation in the 3T3-L1 cell line	J. Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry		DOI:10.1111/j.php.12306	국외		SCI
3	Microbial ketonization of ginsenosides F1 and C-K by <i>Lactobacillus brevis</i>	Antonie Van Leeuwenhoek		106:1215	국외		SCI
4	Effect of Fermented Red Ginseng Extract Enriched-in-ginsenoside Rg3 on the Differentiation and Mineralization of Pre-osteoblastic MC3T3-E1 Cells.	Journal of Medicinal Food		18:542	국외		SCI
	<i>Arthrobacter ginsengisoli</i> sp. nov., isolated from soil of a ginseng field	Archives microbiology		(accepted)	국외		SCI
5	Stimulative Effect of Ginsenosides Rg5:Rk1 on Murine Osteoblastic MC3T3-E1 Cells	PHYTOTHERAPY RESEARCH		28:1447	국외		SCI
6	<i>Lactobacillus vespulae</i> sp. nov., isolated from gut of a queen wasp (<i>Vespula vulgaris</i>)	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	Van-An Hoan	65:3326	국외		SCI
7	Effect of White, Red and Black Ginseng on Physicochemical	Plant Foods Hum Nutr	Yan Jin	70:141	국외		SCI

	Properties and Ginsenosides						
8	<i>Sphingomonas panacis</i> sp. nov., isolated from rhizosphere of rusty ginseng	Antonie van Leeuwenhoek	Priyanka Singh	108:711	국외		SCI
9	<i>Cupriavidus yeoncheonense</i> sp. nov., isolated from soil of ginseng	Antonie van Leeuwenhoek	Priyanka Singh	107:749	국외		SCI
10	<i>Microbacterium panaciterrae</i> sp. nov., isolated from the rhizosphere of ginseng	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	Ngoc-Lan Nguyen	65:927	국외		SCI
11	Structural investigation of ginsenoside Rf with PPAR γ major transcriptional factor of adipogenesis and its impact on adipocyte	JGR	Fayeza Md Siraj	141	국내		SCI
12	<i>Burkholderia ginsengiterrae</i> sp. nov. and <i>Burkholderia panaciterrae</i> sp. nov., antagonistic bacteria against root rot pathogen <i>Cylindrocarpon destructans</i> , isolated from ginseng soil	Arch. Microbiology		197:439	국외		SCI
13	<i>Paracoccus panacisoli</i> sp. nov., isolated from a forest soil cultivated with Vietnamese ginseng	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology		65:1491	국외		SCI
14	<i>Sphingomonas panaciterrae</i> sp. nov., a plant growth promoting bacterium isolated from soil of a ginseng field	Arch Microbiol		197:973	국외		SCI
15	<i>Paralcaligenes ginsengisoli</i> sp. nov., isolated from	Antonie van Leeuwenhoek		108:619	국외		SCI

	ginseng cultivated soil						
16	Enzymatic transformation of major ginsenoside Rb1 to Compound K by <i>Weisella helinica</i> . 2015. <i>Indain Journal of Biotechnology</i>	Indain Journal of Biotechnology		14:270	국외		SCI
17	<i>Humibacter ginsengiterrae</i> sp. nov., and <i>Humibacter ginsengisoli</i> sp. nov., isolated from soil of a ginseng field	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology		65:2734	국외		SCI
18	<i>Microbacterium rhizomatis</i> sp. nov., a β -glucosidase-producing bacterium isolated from rhizome of Korean mountain ginseng	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology		65:3196	국외		SCI
19	Inhibition of Osteoclast Differentiation by Ginsenoside Rg3 in RAW264.7 Cells via RANKL, JNK and p38 MAPK Pathways Through a Modulation of Cathepsin K: An In Silico and In Vitro Study	PHYTOTHER APY RESEARCH		29:1286	국외		SCI
20	<i>Lactobacillus vespulae</i> sp. nov., isolated from gut of a queen wasp (<i>Vespula vulgaris</i>)	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology		65:3326	국외		SCI
21	<i>Labrys soli</i> sp. nov., isolated from the rhizosphere of ginseng	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology		65:3913	국외		SCI
22	<i>Paenibacillus panaciterrae</i> sp. nov., isolated from	International Journal of		65:4080	국외		SCI

	ginseng-cultivated soil	Systematic and Evolutionary Microbiology					
23	Biosynthesis of Anisotropic Silver Nanoparticles by <i>Bhargavaea indica</i> and Their Synergistic Effect with Antibiotics against Pathogenic Microorganisms	Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanomaterials					
24	<i>Chryseobacterium panacis</i> sp. nov., isolated from ginseng soil	Antonie van Leeuwenhoek	109:187	국외			SCI
25	<i>Duganella ginsengisoli</i> sp. nov., isolated from ginseng soil	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	66:56	국외			SCI
26	Microbial deglycosylation and ketonization of ginsenoside by <i>Cladosporium cladosporioide</i> and their anticancer activity	Antonie van Leeuwenhoek	109:179	국외			SCI
27	<i>Paenibacillus puernese</i> sp. nov., a β glucosidase producing bacterium isolated from Pu'er tea	Arch Microbiol	198:211	국외			SCI
28	Ginsenoside Rg5:Rk1 attenuates TNF- α /IFN- γ -induced production of thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) and LPS-induced NO production via downregulation of NF- κ B/p38 MAPK/STAT1	In Vitro Cell.Dev.Biol. - Animal	52:287	국외			SCI

	signaling in human keratinocytes and macrophages						
29	Extracellular synthesis of silver and gold nanoparticles by <i>Sporosarcina koreensis</i> DC4 and their biological applications	Enzyme and Microbial Technology		75	국외		SCI
30	Green synthesis of silver nanoparticles by <i>Bacillus methylotrophicus</i> , and their antimicrobial activity	Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology		44:1127	국외		SCI
31	Green synthesis of multifunctional silver and gold nanoparticles from the oriental herbal adaptogen: Siberian ginseng	International Journal of Nanomedicine		11:3131	국외		SCI
32	Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms	Trends in Biotechnology		37:588	국외		SCI
33	Suppression of MAPKs/NF- κ B Activation Induces Intestinal Anti-Inflammatory Action of Ginsenoside Rf in HT-29 and RAW264.7 Cells	IMMUNOLOGICAL INVESTIGATIONS		45(5):439	국외		SCI
34	Rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles using <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extract and their anticancer activities	International Journal of Nanomedicine		11:3691	국외		SCI
35	<i>Phenylobacterium panacis</i> sp. nov., isolated from the rhizosphere of rusty mountain ginseng	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology		66:2691	국외		SCI
36	Microbial synthesis of	Artificial		44:1469	국외		SCI

	Flower-shaped gold nanoparticles	Cells, Nanomedicine, and Biotechnology					
37	Weissella oryzae DC6-facilitated green synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial potential	Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology	44:15	국외			SCI
38	Pseudomonas deceptionensis DC5-mediated synthesis of extracellular silver nanoparticles	Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology	44:1576	국외			SCI
39	Flavobacterium panacisoli sp. nov., isolated from soil of a ginseng field	Arch Microbiol	198(7): 645	국외			SCI
40	Characterization and antimicrobial application of biosynthesized gold and silver nanoparticles by using Microbacterium resistens	Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology	44:1714	국외			SCI
41	Enzymatic transformation of ginseng leaf saponin by recombinant β -glucosidase (bgp1) and its efficacy in an adipocyte cell line	Biotechnology and Applied Biochemistry	63:532	국외			SCI
42	Anticancer activity of silver nanoparticles from Panax ginseng fresh leaves in human cancer cells	Biomedicine & Pharmacotherapy	84:158	국외			SCI
43	The inhibitory mechanism of compound K on A549 lung cancer cells through EGF pathway: an in silico and in vitro approach	CURRENT SCIENCE	111:1071	국외			SCI
44	A strategic approach for rapid synthesis of gold and silver nanoparticles by Panax	Artificial Cells, Nanomedicine, and	44:1949	국외			SCI

	ginseng leaves	Biotechnology					
45	Therapeutic potential of compound K as an IKK inhibitor with implications for osteoarthritis prevention: an in silico and in vitro study	In Vitro Cell.Dev.Biol. – Animal		52:898	국외		SCI
46	Intracellular synthesis of gold nanoparticles with antioxidant activity by probiotic Lactobacillus kimchicus DCY51T isolated from Korean kimchi	Enzyme and Microbial Technology		95:85	국외		SCI
47	Protopanaxadiol aglycone ginsenoside-polyethylene glycol conjugates: synthesis, physicochemical characterizations, and in vitro studies	Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology		44:1803	국외		SCI

기술이전

No.	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	자체 실시	발효물 원료 기술 실시 약정	한방바이오	2015.10	-	
2	자체 실시	특허 균주 및 화장품 발효물 기술 실시 약정	지에프씨	2016.10	-	
3	자체 실시	유산균 발효 원천기술 관련 실시 약정	한방바이오	2016.12	-	

기술사업화								
번호	제품(상품)명	제품(상품)설명	활용 업체명	사업화 여부	매출 발생여부	제품 매출액	고용 창출	R&D 기여율
1	발효홍삼/황칠 농축액	개발 미생물을 활용한 홍삼 발효 및 추출 농축물 제조	한방바이오 (주)	시제품	-	-	-	50%
2	미생물 생균 분말	개발 미생물의 probiotics용 시제품	한방바이오 (주)	시제품	-	-	-	100%
3	바이오투스	건강기능식품	한방바이오 (주)	시제품				25%
4	황칠&산삼배양 근 비누	비누제품	한방바이오 (주)	시제품				25%
5	장봉근 명품발효 마퀴베리 골드	발효제품	한방바이오 (주)	시제품				25%
6	인삼사포닌	화장품원료	지에프씨	사업화				30%
7	PhytoG Bio goldginseng	화장품원료	지에프씨	사업화				30%
8	PhytoG Supernova	화장품원료	지에프씨	사업화				30%
9	PhytoG Goldginseng	화장품원료	지에프씨	사업화				50%
10	Biogoldginseng	마스크팩	지에프씨	시제품				25%
11	Supernova	마스크팩	지에프씨	시제품				25%
12	M4정제	식품	샘표	시제품				80%
13	M4캡슐	식품	샘표	시제품				80%
14	M4스틱포	식품	샘표	시제품				80%
15	M4앰플	식품	샘표	시제품				80%

제2절 연구개발결과의 활용방안

○ 활용방안

- 개발된 신규 한국형 토종 미생물은 과학적인 기능성 검증 체계를 확립하여 실질적 기능성 효과에 기반한 기능별 적용을 할 계획임
- 본 연구의 최종 목표는 기 연구 개발된 신종의 토종 한국형 미생물의 활용에 대한 기술적인 향상을 통해 실제 상품화로서 미생물 자원에 대한 원천기술의 확보를 통해 국제적인 경쟁력을 확보할 계획임

3절 정성적 성과

○ 기대성과(기술적 측면)

- 한국형 신규 토종 미생물의 분리 개발은 국외의 미생물 자원에 의존하던 기존의 기술적 한계에서 벗어나 원천기술을 확보함으로써 기술적 주권을 가질 수 있음
- 미생물의 기능성 증진 및 표준화를 이룰 수 있음
- 미생물 발효에 의한 유효성분 조절 기술은 기존의 특정 성분의 강화와는 차별되는 기술로 타겟 효능에 대한 맞춤형 제품 개발의 원천기술로 활용될 수 있음
- 유효성분의 선택적 추출 및 기호도 개선 기술은 현장에서 적용 가능한 공정기술로 연결시켜 실용화 및 산업화를 조기에 추진할 수 있음
- 균주 자체의 원천적 기술 및 특허의 확보로 향후 산업적으로 다양한 분야에 적용이 가능하며 특히, 건강기능식품 및 의료, 화장품 등에서 신 제형 개발이 가능하며, 제조 공정 시스템의 표준화로 생산성, 안전성, 기술성 향상을 이룰 수 있음

○ 기대성과(경제·산업적 측면)

- 개발된 신종의 한국형 미생물은 대량생산 방법에 개발에 따라 경제적으로 생산 보급 용이하며, 기능성 제품 생산업체는 안전한 고기능성 미생물 균주의 안정적 확보에 따른 제품 경쟁력을 강화할 수 있음
- 미생물의 기능성에 따라 각각 생산 될 소재는 식품, 기능성 식품, 일반식품, 화장품 등의 다양한 분야의 제품에 적용하여 제품 다양화를 통한 국내·외 시장 형성이 가능함
- 선진국에서 고가의 비용을 지불하고 사용하던 미생물자원을 국산의 자원으로 변경함으로써 외화 유출 및 생산비용의 절감을 통해 국가적인 경쟁력을 확보 할 수 있음
- 미생물 자원은 다양한 산업에 폭넓게 적용가능하여 식품 시장 뿐 아니라 화장품, 바이오 의약산업, 환경산업등에 적용가능하여 고부가가치 제품 시장 확대가 가능
- 본 연구에서 개발하고자 하는 제품군은 중장년층을 겨냥한 건강기능성식품 및 20-30대 젊은 층을 겨냥한 화장품 소재, 스포츠 음료 까지 전 연령층에 걸쳐 각종 제품의 개발이 가능하며 특히, 노령화 사회에서 면역력이 저하된 노인층을 대상으로 한 면역증진 제품으로 기능성 제품의 소비자 스펙트럼을 확대하여 전체 산업의 동반성장을 주도할 수 있으며 각종 발효에 필요한 농산물의 수요증대로 농가 소득의 증대를 기대 할 수 있음

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
<p>1. Chemopreventive Effects of Heat-processed Panax quinquefolius Root on Human Breast Cancer Cells (Anticancer Research 2008, 28:2545-2551)</p> <p>; 본 연구 논문은 화기삼(북미삼)을 홍삼화하여 다양한 사포닌을 제조한 후 이의 항암활성에 대하여 알아본 것이다. 최근 화기삼의 열처리를 통한 기존의 수삼 및 백삼에 존재하지 않았던 사포닌의 생산을 통해 화기삼에도 다양한 사포닌이 존재 할 수 있다는 것이 알려지고 있으며 이에 따라 화기삼에 비하여 사포닌의 종류가 다양하다는 장점을 지닌 고려인삼의 경쟁력이 저하되고 있는 실정으로 고려인삼을 활용하여 단순 물리가공 처리로 생산 될 수 없는 다양한 사포닌을 생산함으로써 비교 우위에 있을 수 있는 다양한 원천기술 확보가 반드시 이루어져야 할 것으로 사료된다.</p>	
<p>2. Inhibiting effects of total saponins of panax ginseng on immune maturation of dendritic cells induced by oxidized-low density lipoprotein (Cellular Immunology , 2010, 263:99)</p> <p>; 이 논문에서는 본연구진과 마찬가지로 인삼사포닌에 의한 수지상세포의 성숙화 억제를 언급하고 있다. 하지만, 본 연구진이 단핵세포에서 수지상세포로의 분화 과정에서 인삼사포닌의 간섭에 포커스를 맞춘 반면 논문의 저자들은 이미 분화된 미성숙 수지상세포에서의 성숙화 여부에 포커스를 맞추고 있다. 또한 본 논문에서는 다른 신호전달 기전보다 PPAR-γ에 의한 low-density lipoprotein에 의한 수지상세포의 성숙화억제를 강조한 것이 본 연구진의 결과와의 차이점이다. 하지만, 인삼사포닌에 의한 수지상세포의 기능 억제라는 측면에서는 본 연구진의 연구결과를 뒷받침 해줄 수 있을 거라 생각 된다.</p>	
<p>3. Effects of Panax ginseng on Tumor Necrosis Factor-α-Mediated Inflammation: A Mini-Review (Molecules, 2011, 16:2802)</p> <p>; 본 연구 논문은 인삼사포닌의 단일 분자들에 초점을 맞추어 각각의 단일 분자들이 체내 면역반응 및 염증반응에 미치는 영향에 대해서 보고하고 있다. 본 논문의 내용에 따르면 대부분의 인삼사포닌 단일분자들은 항염증반응에 대한 기능을 가지고 있지만, 이러한 반응을 유도하는 신호전달 기전은 각각의 단일분자에 따라 조금씩 다른 메커니즘을 가지고 있다고 설명하고 있다. 본 연구진이 연구과제를 수행함에 있어 사용한 인삼사포닌은 단일 물질 Re, Rh, compound K, 그리고 total saponin이었다. 따라서 각각의 물질들이 가지는 기전에 조금씩 차이가 나는 것에 대한 증빙자료로서 본 논문은 가능성을 시사해준다.</p>	
<p>4. Dendritic Cells Promoted by Ginseng Saponins Drive a Potent Th1 Polarization (Biomark Insights. 2008, 3).</p> <p>; 본 연구논문은 인삼의 특정 성분들이 단핵세포로부터 수지상세포로의 분화를 촉진하고 또한 특정 사이토카인 (IL-12)의 분비를 증가 시켜 결론적으로 Th1 세포의 분화를 유도한다는 내용을 보고하고 있다. 이는 본 연구진이 발표한 내용과는 상반되는 결과이다. 하지만 본</p>	

연구논문에서 다루고 있는 인삼사포닌의 단일 성분은 인삼사포닌으로부터 직접 추출한 성분이 아닌 이것을 *in vitro* metabolic 과정을 통해 성분 변환을 시킨 물질로 본 연구진이 사용한 인삼사포닌과는 상이한 성질을 보일 것으로 판단된다. 또한 본 연구논문 뿐만 아닌 타 논문에서도 이렇듯 성분을 변환 시킨 인삼사포닌 단일물질의 연구결과는 서로 조금씩 다른 기능과 함께 다른 가능성을 제시한다. 이는 작용기전을 보다 심도있게 연구함으로써 인삼사포닌의 응용 및 이용 확대에 도움을 줄 있을 것으로 판단된다.

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당 사항 없음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	코드번호		비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호
					구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)		

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<ul style="list-style-type: none"> ○ 실험 윤리 및 실험 방법 준수하도록 책임 및 지도 ○ 실험실 안전수칙 준수 ○ 실험실 안전 관리를 위한 분기별 안전점검 실시 ○ 화학물질 및 가스 사용에 따른 분기별 소방점검 실시 ○ 매년 유해인자 확인에 따른 건강검진 실시 		

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

										코드번호	D-12
지식재산권[발명특허, 실용신안, 의장, 상표, 규격], 신품종 , 프로그램개발 등으로 구분하고, 세부적으로 전부(건별로)기록하며, 국외인 경우 반드시 국명을 기록합니다]											
구분	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기타		
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호			
특허출원	신규한 식물 생장 촉진 미생물 및 이의 용도진세노사이드	대한민국	경희대학교 산학협력단	2015.03.20	10-2015-0038984						
특허출원	케톤화된 진세노사이드의 제조방법 및 이의 이용	대한민국	경희대학교 산학협력단	2015.04.28	10-2015-0060044						
특허출원	진세노사이드 화합물 K 및 글리콜 키토산의 체 및 이의 용도	대한민국	경희대학교 산학협력단	2015.03.17	10-2015-0036992						
특허출원	진세노사이드 유도체의 제조방법 및 이에 의해 제조된 진세노사이드 유도체를 유효성분으로 포함하는 미백 및 주름개선용 조성물	대한민국	경희대학교 산학협력단	2014	10-2014-0002872						
특허출원	PPT 계열의 진세노사이드 함량을 증가시키는 인삼 조직배양방법	대한민국	샘포식품주식회사	15.09.14	10-2015-0129784						
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)				
1	Enzymatic transformation of ginseng leaf	Biotechnolog yfund	Md. Amdad	63:532	국외		SCI				

	saponin by recombinant β -glucosidase (bgp1) and its efficacy in an adipocyte cell line	Applied Biochemistry	ul Huq				
2	Microbial ketonization of ginsenosides F1 and C-K by <i>Lactobacillus brevis</i>	Antonie Van Leeuwenhoek		106:1215	국외		SCI
3	Effect of Fermented Red Ginseng Extract Enriched-in-ginsenoside Rg3 on the Differentiation and Mineralization of Pre-osteoblastic MC3T3-E1 Cells.	Journal of Medicinal Food		18:542	국외		SCI
4	<i>Lactobacillus vespulae</i> sp. nov., isolated from gut of a queen wasp (<i>Vespula vulgaris</i>)	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	Van-An Hoan	65:3326	국외		SCI
5	Enzymatic transformation of major ginsenoside Rb1 to Compound K by <i>Weissella helinica</i> . 2015. <i>Indain Journal of Biotechnology</i>	Indain Journal of Biotechnology		14:270	국외		SCI

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○		

12. 참고문헌

	코드번호	D-14
1. Jung HK, Lim SK, Park MJ, Bae CS, Yoon KC, Han HJ, and Park SH. The protective effect of ginseng saponin against high glucose-induced secretion of insulin-like growth factor (IGF)-I in primary cultured rabbit proximal tubule cells. <i>J Ginseng Res.</i> 2009; 33: 26-32.		

2. Hong HD, Choi SY, Kim YC, Lee YC, and Cho CW. Rapid determination of ginsenosides Rb₁, Rf, and Rg₁ in Korean ginseng using HPLC. *J Ginseng Res.* 2009;33: 8-12.
3. Lee DY, Cho JG, Lee MK, Lee JW, Park HJ, Lee YH, Yang DC, and Baek NI. Standardization of physico-chemical data for ginseng saponins-I. Identification of NMR data for ginsenoside Rg₁. *J Ginseng Res.* 2009; 32: 291-299.
4. Lee CR, Whang WK, Shin CG, Lee HS, Han ST, Im BO, and Ko SK. Comparison of ginsenoside composition and contents in fresh ginseng roots cultivated in Korea, Japan, and China at various ages. *Korean J Food Sci Technol.* 2004; 30: 847-850.
5. Park JD. Study on chemical constituents from *Panax ginseng*. p. 79. In: The Korean Society of Ginseng (ed), *Ginseng Research during the Past 20 Years*. The Korean Society of Ginseng, Seoul(1997)
6. Dong A, Ye M, Guo H, Zheng J, and Guo D. Microbial transformation of ginsenoside Rb₁ by *Rhizopus stolonifer* and *Curvularia lunata*. *Biotechnol Lett.* 25: 339-344 (2003)
7. Du Q, Jerz G, Waibel R, and Winterhalter P. Isolation of dammarane saponins from *Panax notoginseng* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr. A.* 1008: 173 (2003)
8. Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Taniyama T, and Takino Y. Studied on Absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponin. VI. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside-Rb₂ in the stomach of rats. *Chem Pharm Bull.* 39: 400 (1991)
9. Kim Y-H, Lee Y-G, Choi K-J, Uchida K, and Sujuki, Y. Transglycosylation to ginseng saponins by cyclomaltodextrin glucanotransferases. *Biosci Biotechnol Biochem.* 65: 875 (2001)
10. Xuesong Z, Juan W, Jie L, Ling F, Juan G, Xiuli D, Hongtao B, Yifa Z, and Guihua T. Highly selective biotransformation of ginsenoside Rb₁ to Rd by the phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36: 721-726 (2009)
11. Yang T, Kasai R, Zhou J, and Tanaka O. Dammarane saponins of leaves and seeds of *Panax notoginseng*. *Phytochemistry* 22: 1473 (1983)
12. Cao X-L, Tian Y, Zhang T-Y, Liu Q-H, Jia L-J, and Ito Y. Separation of dammarane-saponins from notoginseng, root of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen, by HSCCC coupled with evaporative light scattering detector. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 26: 1579-1591 (2003)
13. Cheng LQ, Kim MK, Lee JW, Lee YJ, and Yang DC. Conversion of major ginsenoside Rb₁ to ginsenoside F₂ by *Caulobacter leidyia*. *Biotechnol Lett.* 28: 1121-1127 (2006)

14. Liu C, Han, JY, Duan YQ, Xin H, and Hua W. Purification and quantification of ginsenoside Rb₃ and Rc from crude extracts of caudexes and leaves of *Panax notoginseng*. *Sep Purif Technol.* 54: 198-203 (2007)
15. Wei GM, Masanori M, Karl EM, Shao LL, Bertrand D, and Satoshi T. Saponins from the roots of *Panax notoginseng*. *Phytochemistry* 52: 1133-1139 (1999)
16. Wei W, Yuqing Z, Elizabeth RR, Donald LH, Hui W, and Ruiwen Z. *In vitro* anti-cancer activity and structure-activity relationships of natural products isolated from fruits of *Panax ginseng*. *Cancer Chemother Phamacol.* 59: 589-601 (2007)
17. Xuesong Z, Juan W, Jie L, Ling F, Juan G, Xiuli D, Hongtao B, Yifa Z, and Guihua T. Highly selective biotransformation of ginsenoside Rb₁ to Rd by the phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* (*syn. Fulvia fulva*). *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36: 721-726 (2009)
18. Teng R, Li H, Chen J, Wang D, He Y, and Yang C. Spectral assignments and reference data. *Magn Reson Chem.* 40: 483 (2002)
19. Oura H, Kumakai A, Shibata S, and Takaki K. Chemical constituents of *Panax ginseng*. pp. 46-47. In: *Panax ginseng ; It's study and progress*. Kyoritz Press Ltd., Tokyo(1981)
20. Karikura M, Miyase T, Tanizawa H, Taniyama T, and Takino Y. Studied on Absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponin. VII. Comparison of the decomposition modes of ginsenoside-Rb₁, and -Rb₂ in the digestivetract of rats. *Chem Pharm Bull.* 39: 2357 (1991)
21. Sanada S, Kondo N, Shoji J, Tanaka O, and Shibata S. Studied on the saponins of ginseng. I. Structures ginsenoside-Ro, -Rb₁, -Rb₂, -Rc and-Rd. *Chem Pharm. Bull.* 22: 421 (1974)
22. Yahara S, Kaji K, and Tanaka O. Further study on dammarane-type saponins of roots, leaves, flower-buds, and fruits of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Chem Pharm Bull.* 27: 88-92 (1979)
23. Dong A, Ye M, Guo H, Zheng J, and Guo D. Mecrobial transformation of ginsenoside R₁ by *Rhizopus stolonifer* and *Curvularia lunata*. *Biotechnol Lett.* 25: 339-344 (2003)
24. Teng R, Ang C, McManus D, Armstrong D, Mau S, and Bacic A. Regioselective acylation of ginsenosides by *Novozyme 435* to generate molecular diversity. *Helv Chim Acta.* 87: 1860-1872 (2004)
25. Wang H, Tong Y-X, Ye W-C, and Zhao S-X. Studies on chemical constituents in root of *Polygala tenuifolia*. *China J Chinese Materia Medica* 28: 830-833 (2003)
26. The rhamnosidase was purified from *Aspergillus sp.* in obtained from local Me-ju. The molecular weight of the enzyme was about 49000 Da.
27. Compared with naringinase from *P decumbens* and *Aspergillus sp.* from Me-ju,

Aspergillus sp. has both activity of rhamnosidase and *B*-glucosidase. However, the enzyme has relatively higher rhamnosidase activity. *P. decumbens* naringinase has a strong *B*-glucosidase activity with rhamnosidase

28. The enzyme had an optimum pH of 4.5. It did not show any thermostability, and was not stable over 40 °C
29. The enzyme was able to react with naringin, soy saponin, say isoflavon to produce biotransform products. Those products need to be further investigate
30. Grassin, C. and Fauquembergue, P., 1996. Fruit juices. In: Godfrey, T. and West, S., Editors. Industrial Enzymology (2nd edition ed.), Macmillan Press, New York, pp. 225–264
31. Kefford, J.F., 1959. The chemical constituents of citrus fruits. *Adv Food Res* 9, p. 285
32. Yusof, S., Gazali, H.M. and King, G.S., 1990. Naringin content in local citrus fruit. *Food Chem* 37, pp. 113–121
33. Hasegawa, S. and Maier, V.P. 1993 Solution to the limonin bitterness problem of citrus juices. *Food Technol.* 37, 73–77.
34. Johnson, R.L. and Chandler, B.V. 1988 Adsorptive removal of bitter principles and titrable acids from citrus juices. *Food Technol.* 45, 130–137.

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 한국형 신규 유산균 발균을 통한 고부가가치 발효 진세노사이드 소재 개발						
	(영문) Development of high valuable products by fermentation of <i>Lactobacillus</i> isolated in Korea						
주 관 연 구 기 관	경희대학교		주 관 연 구 책 임 자	(소속)경희대학교			
참 여 기 업	샘포식품(주), (주)웅진식품, 한방바이오(주), (주)지에프씨		총 연 구 기 간	(성명)양덕춘			
총 연구개발비 (1,535,000천원)	계		총 연 구 기 간	2013. 11. 20 ~ 2017. 3 . 19 (3년 4월)			
	정부출연 연구개발비	900,000		총 인 원	120		
	기업부담금	635,000		총 참 여 연 구 원 수	내부인원	120	
	연구기관부담금				외부인원		
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 국내 토종 미생물 자원의 분리 확보를 통한 고기능성 소재의 발굴 - 상품화를 위한 목표 기술로써 미생물 발효를 통한 기능물질 개발을 통한 원료 생산기술, 효능 타겟형 유효성분 조절기술, 소비자 부합형 기호도 개선기술, 시장진입을 위한 제형 및 제품화 기술을 개발함 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 기 확보 한국형 신종 유용균주의 상업화를 위한 기술개발 <ul style="list-style-type: none"> - 선행연구를 통해 개발된 균주의 기능 특성화 - 이차대사산물 분해 및 합성 관련 활성 균주 개발 - 면역 활성 검정을 통한 면역력 강화 균주의 개발 ○ 면역활성증진 기능성 식품개발 <ul style="list-style-type: none"> - 유산균을 활용한 면역활성 프로바이오틱 소재 개발 - 혼합배양을 활용한 면역력 증진 기능성 소재 개발 - 기능성 소재의 표준화를 위한 분석법 개발 ○ 연구개발물질의 상용화를 위한 제형화 및 제품화 							

- 기능성 제품 등록을 위한 절차 및 관련제도 조사
 - 원료, 가공공정 제품 표준화를 위한 프로세스 확립
 - 최종 Prototype의 가공적성/안전성/안정성 실험
 - 브랜드 naming, 마케팅 타겟 설정, 초기 런칭을 위한 홍보체계 구축
- 총 사포닌 함량 증대 인삼/산삼배양근 배양기술을 개발함.
- 사포닌 증대 조직배양 표준화를 위한 프로세스 확립
 - 최적 Growth curve에 따른 생산 표준화를 위한 프로세스 확립
- 특수사포닌 및 그 전구체 대량 생산을 위한 균주 및 발효 기술을 개발함.
- 진세노사이드 전환 프로세스 확립
 - 진세노사이드 전환율에 따른 발효공정 표준화를 위한 프로세스 확립
- 향산화/피로회복/면역 등의 다양한 기능성을 확인함.
- 기능성 관련 추출, 분리, 정제 기기분석, *In vitro*, *In vivo* 프로세스 확립
- 상품화를 위한 목표 기술로써 시장 진입을 위한 제형 및 제품화 기술을 개발함.
- 원료, 가공공정, 제품 표준화를 위한 프로세스 확립
 - 최종 Prototype의 가공적성/안전성/안정성 실험
- 유용균주와 식물 이차대사산물을 활용한 고기능 소재 및 제품 개발
- 미생물과 열처리를 통한 진세노사이드 Rg2 및 C-K의 대량생산
 - 변환된 진세노사이드 Rg2 및 C-K에 의한 면역강화제품 개발
 - 발효를 통한 황칠나무로부터 특수 사포닌의 대량생산
 - 발효 황칠엑스를 이용한 고부가가치 비누 및 향장품의 개발
- 발효를 통한 기능성 화장품 소재 개발 및 제품화
- 전처리 공정, 선택적 추출, 조합 기술 발효기술을 활용한 기능성 개선
 - 발효물의 profile 분석 및 발효생성물의 구조 동정
 - 효능평가를 통한 기능성 타겟 물질의 선정
 - 기능성 화장품 원료 개발 및 시생산
 - 기능성 평가를 위한 임상 연구
- 미생물발효를 통한 Ginsenoside C-K 고함유 기능성 제품개발
- 미생물 발효를 통한 인삼 고기능성 사포닌 개발
 - 발효를 통한 Ginsenoside C-K 타겟 기능성 물질 생산
 - 기준 규격 및 함량 시험
 - 국내 농산물과 유용균주의 혼합을 통한 고기능성화
 - 효능물질 발굴 연구를 통한 제품의 표준화

- 인삼 기능성 강화 제품 개발

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 고기능성 원료생산 기술 확보 및 원료의 표준화

- 효능 타겟형 인삼의 유효성분을 조절할 수 있는 원천 기술 확보

- 개발기술의 참여기업 등을 통한 상업화로 기능성식품, 일반식품, 화장품 제품 개발

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.